

**Methodischer
Beitrag zur Viruszüchtung
im Exembryonierten Brutei.**

**Inaugural-Dissertation
von
Werner Schwirz**

2

1961

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Universität Mainz.

(Ehem. Direktor: Prof. Dr. H. Kiewe)

M E T H O D I S C H E R B E I T R A G Z U R V I R U S -

Z Ü C H T U N G I M E X E M B R Y O N I E R T E N

B R U T E I

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Johannes Gutenberg - Universität

Mainz

vorgelegt von
WERNER SCHWIRZ
aus Eppelborn / Saar

Mainz 1961



Dekan: Prof. Dr. Dr. K. Lang
Referent: Dozent Dr. E. v. Wasielewski
Korreferent: Prof. Dr. H. Klieve

Tag der mündlichen
Prüfung 12. Februar 1962

I N H A L T V E R Z E I C H N I S

I. Die Bedeutung des Bruteis als Testobjekt für Virusuntersuchungen

- A) Einleitung*
- B) Das Influenzavirus*
- C) Eigenschaften und Vermehrung des Influenzavirus im Brutei*
 - 1) Verbreitung im Brutei*
 - 2) Infektionsweg*
 - 3) Infektionsarten im Brutei*
 - a) Injektion in die Allantoishöhle*
 - b) Injektion in den Dottersack*
 - c) Injektion auf die gesenkte Chorioallantois*
 - d) Injektion in den Amnionsack*
 - e) Weitere Methoden*
 - 4) Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile der Viruszüchtung im intakten Brutei*
- D) Das exembryonierte Brutei als Testobjekt für vermehrungshemmende und -fördernde Substanzen*
 - 1) Bisherige Ergebnisse*

II. Eigene Untersuchungen

- A) Versuchsgruppe I*
Verbesserung des Exembryonierungsverfahrens
- B) Versuchsgruppe II*
Verbesserung des Nährsubstrates
 - 1) Ergebnisse*
 - 2) Auswertung der gewonnenen Ergebnisse*

III. Das Cortison und seine Wirkung auf den Zellstoffwechsel und die Virusinfektion

- A) Zell- und Virusstoffwechsel*
- B) Cortison und seine Wirkungsweise*
 - 1) Cortisoneinwirkung auf den Stoffwechsel*
 - 2) Cortisoneinwirkung auf die Atmung*
 - 3) Cortisoneinwirkung auf die Virussynthese*
 - 4) Cortisoneinwirkung auf die Zellmembran*
 - 5) Cortisoneinwirkung auf den Enzymapparat*
 - 6) Zusammenfassung (Schema)*

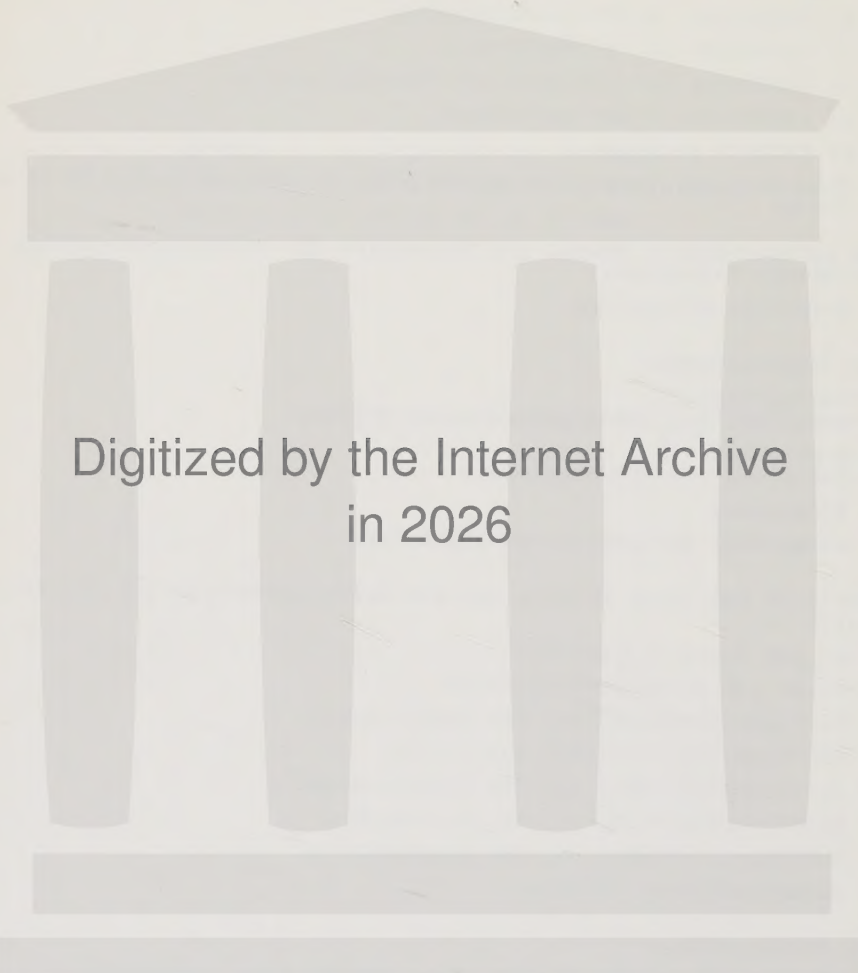
IV. Eigene Untersuchungen

- A) Einfluß des Cortisons auf das Wachstum der Hühnerembryonen*
- B) Einfluß des Cortisons auf die Zellatmung*
- C) Einfluß des Cortisons auf die Virusvermehrung im exembryonierten Brutei*

V. Diskussion

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554416_0095

I. Die Bedeutung des Bruteis als Testobjekt für Virusuntersuchungen

Seit um die Jahrhundertwende das Virus als Krankheitserreger bekannt wurde, bemühte man sich auch um eine Züchtungsmöglichkeit außerhalb des Wirtsorganismus. Das war einerseits erforderlich, um übersichtliche Bedingungen für die Virusvermehrung zu erhalten, zum anderen, um von den teuren Versuchen in Tierställen möglichst unabhängig zu werden. Wegen des obligaten Parasitismus der Viren kamen für solche Versuche nur Gewebekulturen in Betracht. Schon 1913 konnten Levaditi bzw. Steinhardt, Israeli und Lambert (54,56) über die erfolgreiche Verwendung von Gewebekulturen zur Vermehrung von Tollwut-, Polio- und Vaccinevirus berichten. In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden die Züchtungsergebnisse ständig verbessert. Als 1931/32 Goodpasture, Woodruff und Buddingh (31) die Züchtbarkeit tierpathogener Viren in der Chorioallantois-membran des bebrüteten Hühnereis entdeckten, war für lange Zeit der endgültige Höhepunkt der Methodik erreicht. Seitdem ist die Viruszüchtung im Brutei zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel der Virusforschung geworden. Die verschiedenartigen Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile dieser Methode sind seither eingehend durchforscht und ständig erweitert worden.

Der Hühnerembryo und seine Häute stellen ein empfindliches Indikatorsystem dar, das den Nachweis der meisten Virusarten ermöglicht. Dadurch gelangte man nicht nur zur Diagnose vieler menschlicher und tierischer Viruskrankheiten, man konnte auch gleichzeitig das Wachstum, die Vermehrung, die Ausbreitung der einzelnen Virusstämme in dieser von der Natur gelieferten Gewebekultur beobachten.

So wachsen eine Anzahl von Viren scheinbar wahllos in den verschiedenen Geweben des Embryos und den umhüllenden Membranen, während andere eine spezifische Affinität zu bestimmten Strukturen des Eis zeigen. Die Viren der Influenzagruppe z.B. zeigen eine bestimmte Vorliebe für die Chorioallantois-membran. Sie ist auch der Hauptsitz ihrer Vermehrung, während alle anderen Gewebe des Embryos weniger günstige Bedingungen für diese Virusgruppe zu bieten scheinen (11). Der Erreger der menschlichen Grippe wird auch deshalb so häufig für Versuche im bebrüteten Hühnerei benutzt, weil er sich nach erfolgter Anpassung an das bebrütete Hühnerei in diesem stark vermehrt, den Embryo in der Regel tötet und außerdem die Eigenschaft hat, Blutzellen von Hühnern und gewissen anderen Tierarten zu agglutinieren, sich also leicht nachweisen läßt (37). So ist es nicht verwunderlich, daß gerade diese Gruppe zum Studium der Pathogenese der Infektion, der Reproduktion und der Wachstumscharakteristiken der Viren und für Versuche über die chemotherapeutische Beeinflussung der Virusinfektionen häufig herangezogen wurde und auch heute noch in zunehmendem Maße benutzt wird.

Beim Influenzavirus, dessen Durchmesser 80 m μ beträgt, unterscheidet man die beiden Typen A und B. Jeder Typ besteht aber noch aus verschiedenen Stämmen, z.B. A (PR8); A (Lepine); B (Crawley) usw. Chemisch gesehen enthält das Grippevirus außer Desoxyribonucleinsäure auch einen erheblichen Anteil an Lipoiden und Kohlehydraten und vielleicht auch etwas Ribonucleinsäure (siehe Tabelle 1) (69). Es ist also ein komplexes Gebilde aus mehreren Komponenten. Serologisch lassen sich 3 verschiedene Anteile differenzieren:

1. das S-Antigen, das typenspezifisch ist,
2. ein stammspezifisches Antigen, das wahrscheinlich mit dem Agglutinin identisch ist und
3. eine wirtsspezifische Komponente.

Nach Ansicht von Hoyle (39) besteht das Influenzavirus aus einem Paket kleinerer Teilchen und zwar dem S-Antigen und dem Agglutinin, die von einer Lipoidhülle umschlossen sind, die aus dem Wirt stammt. Wird das Influenzavirus z.B. aus den Hühnerembryonen isoliert, so enthält es ein Antigen, das serologisch mit dem Protein der Hühnerembryonenzelle verwandt ist (53). Die Fähigkeit des Influenzavirus, rote Blutkörperchen spez. zu agglutinieren, wurde erstmals von Hirst festgestellt (38,37). Diese Reaktion wird durch das Agglutinin verursacht, das eine spez. Affinität zu den Rezeptoren besitzt, die sich in der Wand der Blutkörperchen oder anderer empfänglicher Zellen befinden. Das Agglutinin kann auf enzymatischem Wege die Rezeptoren zerstören. Dadurch wird wahrscheinlich der Eintritt des Virus in die Wirtszelle erleichtert. Fazekas de St. Groth (25) haben allerdings gezeigt, daß das Eindringen in die Zelle nicht nur von der Wirkung der Enzyme abhängt, sondern daß die Virusteilchen auch aktiv von der Zelle selbst aufgenommen werden können.

Tabelle 1 (67)

Chemische Zusammensetzung der Influenzaviren:

Virus	C	N	P	Kohlehydrate	DNS	Lipoide
Influenza A	53,2	10,0	0,97	12,5	2,1	23,4
Influenza B	52,2	9,7	0,94	13,1	3,7	22,4

Über die Verbreitung des Influenzavirus im infizierten Ei, nach Virusinfektion in die Amnionhöhle hat sich wohl am eingehendsten Burnet beschäftigt.

Er erbrachte 1940 (11) den Nachweis, daß Influenza-Virusstämme nach Infektion in die Amnionhöhle den Embryo infizieren und bei diesem charakteristische Tracheal- und Lungenveränderungen erzeugen. Der Virusgehalt der Embryolungen war um ein Vielfaches höher als der der anderen Organe. Die Infektion des Embryos stellte sich Burnet (12) so vor, daß nach Gängigwerden der Trachea am zwölften Bebrütungstage der Erreger mit der Amnionflüssigkeit verschluckt werde und so in die Trachea gelange. Diese Theorie war gestützt auf Versuche mit Trypanblau, das nach Injektion in die Amnionhöhle im oberen Teil des Respirationstraktes und im Verdauungskanal nachgewiesen werden konnte. In die Allantoishöhle gelangte der Farbstoff nicht. Die großen Virusmengen, die nach 22 - 48 Stunden in der Allantoisflüssigkeit nachgewiesen werden konnte, stammten nach der damaligen Auffassung Burnets aus dem Embryo, von dem er annahm, daß er ständig Viren in die Allantois ausscheide. Auch glaubte er daß die Viren in die Amnionflüssigkeit ausgeschieden würden.

In einer späteren Arbeit (12) berichtet derselbe Autor über die Vermehrung im Entoderm der Allantoismembran, nachdem Nigg, Crowley und Wilson (60) eine starke Anreicherung von komplementbildenden Antigenen in der Allantoishöhle festgestellt hatten. Burnet mußte daraufhin seine Theorie der alleinigen Produktion von Viren im Embryo revidieren.

Auch Watson und Coons (87) versuchten, durch spezifische Färbung mit fluoreszierendem Antikörper die hauptsächlichen Stellen der Vermehrung des Influenzavirus im Hühnerembryo nach Amnioninfektion festzustellen und konnten hierbei die von Burnet beobachtete respiratorische Infektion des Embryo bestätigen.

48 Stunden nach der Infektion von 7 - 11 Tage alten Eiern war Virus hauptsächlich im Pharynxepithel des Embryos nachweisbar. Auch im Epithel der Allantois und selten im Peritoneum fanden sich unterschiedliche Virusmengen. In allen anderen Organen und Gewebeanteilen war kein Virus festzustellen. In Übereinstimmung mit Burnet's Befunden enthielten drei von fünf Embryonen, die am zwölften Bebrütungstage, also nach Gängigwerden der Trachea, mit Influenza A infiziert wurden, außerdem beträchtliche Virusmengen im Respirationsepithel.

Die Verbreitung des A-PR8-Stammes nach Allantoisinfektion hat Pearson (61) untersucht. Er arbeitete mit Gruppen von vier Eiern und berechnete die Mittelwerte der einzelnen Gruppen. Schon sechs Stunden p.i. wurden geringe Virusmengen in der Allantoisflüssigkeit in der Chorioallantoismembran, im Embryo und im Dottersack festgestellt, während in der Amnionflüssigkeit keine Viren nachgewiesen werden konnten. Auch 12 Stunden p.i. war die Amnionflüssigkeit noch nicht infektiös, während der Virus in der Membran und Allantoisflüssigkeit stark angereichert war. Die Virusmenge im Embryo und Dottersack lag wesentlich unter der der Chorialallantois.

Welche Rolle das Blut bei der Verbreitung des Influenzavirus im Ei hat, ist bis heute noch wenig geklärt.

Burnet und Bull (15) konnten 1944 Eier durch intravasale Injektion des atypischen Stammes Melbourne in Membranvenen einen hohen Virustiter erzeugen und septikämische Veränderungen beobachten. Damit ist jedoch nicht bewiesen, daß das Virus auch normalerweise auf dem Blutwege in den Embryo gelangt.

Watson und Coons (87) bezweifeln einen intravasalen Infektionsweg auf Grund der beschränkten Verbreitung des Virus im intakten Embryo. Es gelang ihnen, das Grippe-Virus in vitro in Gehirn, Niere, Milz und Gonaden zu züchten, während diese Organe im intakten infizierten Embryo keine mit fluoreszierenden Antikörpern nachweisbaren Virusmengen aufwiesen.

Auch Köhler (52) versuchte, die Bedeutung des Blutes bei der Virusausbreitung zu klären. Er untersuchte nach Infektion in die Allantoishöhle die in mehreren Zeitstufen entnommenen Flüssigkeiten, sowie das hämolysierte Blut

der Membranen und des Embryos und die Membranen, den Embryo und die Dottersackextrakte selbst auf ihren Virusgehalt. Von der achten Stunde ab war das Virus regelmäßig in der Membran, im Embryo, im Dottersack und auch in den Eiflüssigkeiten nachweisbar, während das Blut bei mehreren Eiern keine feststellbaren Virismengen enthielt. Bei Versuchen über die Lokalisation des Virus im Embryo im Frühstadium der Infektion zeigte die Infektiositätsprüfung der Flüssigkeiten und Extrakte, daß sich sechs Stunden p.i. bei allen Eiern die Allantois- und die Amnionflüssigkeit als infektiös erwies und sich bei jeweils der Hälfte der Eier im Nabelstrang, der Haut und dem oberen Respirationstraktus infektionstüchtige Partikel fanden.

Beide Versuche sprechen gegen eine Ausbreitung der Infektion auf dem Blutwege. Köhler hält einmal eine Infektion über die Allantois und den Nabelstrang zum Embryo, zum anderen von der Amnionflüssigkeit zur Haut und dem Respirationstrakt für viel wahrscheinlicher (52).

Die Influenzastämme sind in ihren Eigenschaften sehr variabel, sodaß sich verschiedene Stämme auch im bebrüteten Hühnerei verschieden verhalten können (14). So teilte Burnet (15) mit, daß der an die Chorioallantois gewöhnte Ei-Passagestamm Melbourne sich von allen anderen Influenzastämmen dadurch unterscheidet, daß er den Respirationstraktus des Embryos nicht infiziert.

Untersuchungen von Isaacs und Lindemann (41,40) haben gezeigt, daß bei der Reaktion des Virus mit der Zelle ein bisher unbekannter Stoff entsteht, das von ihnen sogenannte Interferon. Dieses Interferon wurde von den Autoren gewonnen, indem sie Chorioallantoismembranen von bebrüteten Hühnereiern mit thermisch inaktiviertem Influenza-A-Mel-Virus beimpften und dann in vitro bebrüteten. Das Interferon unterscheidet sich vom Influenzavirus schon dadurch, daß es keine hämagglutinierenden Eigenschaften besitzt und durch Antisera nicht neutralisiert werden kann. Außerdem läßt es sich bei Beschleunigungen, welche die Viren sedimentieren, nicht zur Sedimentation bringen. Es wird jedoch durch Filter mit mittlerem Porendurchmesser von 0,5 - 1 μ m sicher zurückgehalten.

Die Infektionsart hat einen starken Einfluß auf die Vermehrung von Viren im Hühnerembryo, da die einzelnen Virusarten bestimmte Gewebe bevorzugen.

Das Vaccinevirus z.B. vermehrt sich ausgezeichnet auf der gesenkten Chorioallantoismembran und wächst in der Allantoishöhle nicht. Vom Menschen stammende Influenza- und Mumpsviren vermehren sich bei ihrer ersten Impfung in das Brut-ei viel eher im Amnion- und Dottersack als in der Allantoishöhle (77).

Im folgenden sollen darum kurz die wichtigsten Infektionsarten mit der entsprechenden Injektionstechnik aufgeführt werden.

Allen Untersuchungen am bebrüteten Brut-ei geht eine Kontrolle der Befruchtung voraus. Nach 3 Bebrütungstagen bei 37°C werden die Eier im verdunkelten Raum durchleuchtet. Ist das Ei befruchtet, so sieht man deutlich die Keimscheibe als roten Fleck und eine sich von der Keimscheibe strahlenförmig ausbreitende Gefäßzeichnung.

Injektion in die Allantoishöhle (s.auch 77,52). Die Allantoisblase ist eine Ausbuchtung des Darmkanals. Sie liegt zwischen dem Amnionsack und der Chorioallantoismembran und erreicht nach elftägiger Bebrütungszeit den größten Umfang. Üblicherweise verwendet man zur Injektion in die Allantoishöhle zehn zehn Tage lang bebrütete Hühnerembryonen. Die Eier werden vorher durchleuchtet, die Grenze der Luftblase markiert und am oberen Rand der Chorioallantoismembran ein gefäßfreier Bezirk angezeichnet. Über diesem Gebiet wird die Eischale mit Jod oder 70%igem Alkohol desinfiziert und dann so durchbohrt, daß möglichst eine Beschädigung der Schalenhaut vermieden wird. Über der Luftblase wird mit einer sterilen Nadel zum Volumenausgleich auch eine Öffnung gebohrt. Die Injektion erfolgt durch waagerechtes Einführen einer sterilen Kanüle in ca. 3 mm Tiefe. Nach der Injektion von normalerweise 0,2 ml Infektionsflüssigkeit oder gelöster Testsubstanz werden beide Löcher durch erhitztes Paraffin verschlossen. Die beimpften Embryonen werden bei 36 - 37°C weiterbebrütet. Im Falle der an die Allantoismembran adaptierten Viren (Geflügelpest, Newcastle-Virus, Influenza-A und -B, Psittakosis, Mumps) genügt in der Regel ein 36-, 48-, 72- bzw. 96-stündiges Nachbebrüten, um die maximale Virusmenge zu erreichen.

Injektion in den Dottersack

Die Dottersubstanz ist von den dem Urdarmepithel des Embryos entsprechenden Zellen umwachsen und so in einen zellwandigen Sack eingeschlossen. Die äußere Wand des Sackes wird von Gewebe mesodermaler Herkunft durchzogen, in dem die Lymph- und Blutgefäße verlaufen.

Die Injektion in den Dottersack erfolgt durch das Loch über der Luftblase. Eine sterile Kanüle wird 4 - 5 cm tief in Richtung auf die Eispitze vorgeschoben. Wir stellten durch Methylenblauinjektionen fest, daß die Injektionsflüssigkeit bei dieser Technik sicher in den Dottersack gelangt.

Das Mumpsvirus, die Influenzaviren menschlicher Herkunft und das Virus der Lymphogranuloma inguinale finden sofort die Bedingungen für ihre Vermehrung in den den Dottersack auskleidenden Zellen.

Injektion auf die gesenkte Chorioallantoismembran

Die Chorioallantoismembran entsteht durch Zusammenwachsen der äußeren Wand der Allantoisblase und des Chorions. Die Chorioallantoismembran ist das Atmungsorgan des Embryos. Für die Impfung auf die Chorioallantois benutzt man im allgemeinen zwölf Tage lang vorbebrütete Hühnereier. Bei der Durchleuchtung des Eis sucht man die Ränder der sich von zwei Seiten vereinigenden Chorioallantoismembran. Am stärksten ist die Membran gegenüber der Verschmelzungslinie entwickelt. Dort sucht man eine gefäßfreie Stelle und schneidet mit einem Zahnbohrer, unter sorgfältiger Schonung der Schalenhaut, ein gleichseitiges Dreieck aus der Kalkschale von etwa 1 cm Seitenlänge. Gleichzeitig wird durch die Wand der Luftblase eine Öffnung gebohrt. Dann werden einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf die Schalenhaut des frei präparierten Dreiecks gebracht. Durch den sterilen Flüssigkeitstropfen wird mit der Spitze einer feinen Pinzette, ohne die darunter liegende Chorioallantoismembran zu verletzen, eine einsige Öffnung durch die Schalenhaut gestochen. Durch die feine Öffnung dringt die Flüssigkeit zwischen die Chorioallantoismembran und die Schalenhaut und trennt beide voneinander. Die Chorioallantoismembran und die Schalenhaut und trennt beide voneinander. Die Chorioallantoismembran senkt sich, der Inhalt des Eis breitet sich in Richtung der Luftblasen aus. Auf diese Weise bildet sich zwischen der gesunkenen Chorioallantoismembran und der Schalenhaut eine neue künstliche Luftblase. Durch die Öffnung der Schalenhaut wird der Impfstoff aus einer senkrecht gehaltenen Pipette oder Spritze unmittelbar auf die Chorioallantoismembran getropft. Anschließend wird die Öffnung in der Kalkschale mit einem entsprechend großen Cellophanstreifen bedeckt und mit Mastix festgeklebt (77).

Auf der Chorioallantoismembran rufen sehr viele Virusarten zirkumskripte, herdförmige Veränderungen hervor. Die Zählung dieser Herde ist eine Methode der quantitativen Virusbestimmung.

Injektion in den Amnionsack

Der Amnionsack wird aus dem inneren Blatt der sich mit dem Embryo vereinigenden somatopleuralen Schicht gebildet. Seine Wand besteht aus mit mesodermalen Elementen verwobenen ektodermalen Zellen.

Die in den Amnionsack geimpften Viren erhalten die Möglichkeit, sich in den verschiedenen Organen des Embryos zu vermehren, so z.B. dem Respirationstrakt, dem Darmkanal und tiefer liegenden Organen.

Vor der Impfung sucht man beim Durchleuchten den Ursprung der großen Allantoisvene und den Embryo. Der Embryo liegt in der Regel 1 - 2 cm unter und neben dem Ursprung der Vene. Die Kalkschale wird auf die gleiche Weise entfernt wie bei der Impfung auf die gesenkte Chorioallantois. Über der Luftblase wird ebenfalls ein Loch gebohrt. Mittels eines Wassertropfens wird die Schalenhaut von der Chorioallantoismembran getrennt und dann die innere Schalenhaut entfernt. Am sichersten führt man die Injektion im verdunkelten Raum mit von unter durchleuchteten Eiern durch. Die Chorioallantoismembran und die Wand der Allantoisblase werden mit einer feinen, am Ende gebogenen Pinzette angehoben und dann die Injektionsnadel unter Sicht des Auges in den Amnionsack eingeführt. Spritzt man aus der neben dem Kopf des Embryos liegenden Nadel Flüssigkeit, so bewegt sich der Kopf des Embryos frei. Noch überzeugender ist es, wenn man ein einziges Luftbläschen einspritzt und sieht, daß dieses im Amnionsack lagert. Tylor und Carmichel (83) führten die Injektion in die Amnionhöhle durch eine, auf der Kalkschale über der Aufenthaltsstelle des Embryos angebrachten kleinen Öffnung aus (83). Gelangt die Nadelspitze in den Amnionsack oder bleibt sie in der Haut des Embryos stecken, so ist im durchleuchteten Ei sichtbar, daß der Embryo den Bewegungen der Nadel folgt. Diese Methode ist nicht nur einfach, sondern auch sehr zuverlässig (6). Die Amnionimpfung ist die auf der ganzen Welt am besten bewährte Methode der primären Züchtung von Influenza- und Mumpsviren menschlicher Herkunft.

In einer Arbeit von Gross und Borneff (35) wird die Technik der Eifensterung, wie sie schon kurz bei der Technik zur Injektion auf die gesenkte Chorioallantois angeführt wurde, sehr genau und eingehend beschrieben und einige Ausführ-

rungsverbesserungen aufgezeigt, die besonders die Pockenzählmethode betreffen.

Bei der von Finter (26) beschriebenen, sogenannten "Membrane Piece Technique" werden Rechtecke von 8 mal 25 mm aus der Chorioallantoismembran von dreizehn Tage lang bebrüteten Eiern gestanzt und in mit Nährlösung gefüllte Teströhrchen gegeben. Die Teströhrchen werden dann mit den gewünschten Virusverdünungen beimpft. So kann eine mit Hilfe der Haemagglutination in vitro durchgeführte Infektiositätsprüfung mit wesentlich geringerem Materialaufwand durchgeführt werden, als dies im allgemeinen zur Feststellung der ID 50 mit Tieren und Hühnereiern notwendig ist.

Das Exembryonierungsverfahren wird noch im Verlauf dieser Arbeit eingehend besprochen.

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich ist, alle Erkenntnisse und Versuche der Virusforschung im Brutei zu Papier zu bringen, werden die zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile dieser Methode hier noch einmal zusammenfassend aufgezählt.

- 1) Das Brutei ist einmal ein viel billigeres und leichter beschaffbares Medium als die üblichen Laboratoriumstiere und Gewebekulturen. Zudem bietet es meist auch bessere Vermehrungsbedingungen und ermöglicht damit eine höhere Virusausbeute. Dies erleichtert natürlich den Nachweis von verschiedenen Virusarten und trägt damit wesentlich zur Diagnose vieler menschlicher und tierischer Viruskrankheiten bei.
- 2) Die Körperflüssigkeiten des Hühnerembryos sind relativ zell- und proteinnarm. Deshalb ist das Brutei zur Herstellung von Impfstoffen und für die Diagnose wichtiger Antigene, bei denen der Reinheitsgrad und die Konzentration des Virus eine wichtige Rolle spielt, besonders geeignet. Auch die Reinigung und Isolierung des Virus ist somit leichter möglich, als aus infiziertem Gewebe, da die Abtrennung des Virus von unerwünschten Ballaststoffen besser möglich ist.
- 3) Damit sind auch die Möglichkeiten für das Studium der Vermehrungsweise und Morphologie der Viren gegeben. Gerade auf diesem Gebiete sind durch die Versuche mit dem Brutei zahlreiche neue Erkenntnisse über das Virus den Forschern vermittelt worden.
- 4) Ein weiterer günstiger Faktor ist darin gegeben, daß sich der Hühnerembryo im allgemeinen frei von natürlichen latenten Infektionen erweist und nicht die Fähigkeit zur Antikörperbildung besitzt. Damit sind im Gegensatz zum Versuchstier wichtige Ursachen ausgeschlossen, die den Versuchsablauf stören und zu falschen Schlußfolgerungen führen können.
- 5) Das wohl häufigste und sehr wichtige Anwendungsgebiet bei Versuchen mit dem Brutei ist die Testung von virostatistischen und viruziden Mitteln. Zu diesem Gebiet gehört auch die Prüfung vermehrungsfördernder Stoffe, die es ermöglichen, die Ausgangsbasis für Untersuchungen an Viren wesentlich zu verbessern.
- 6) Das Brutei eignet sich auch vorzüglich zur ständigen Haltung einer großen Anzahl von mensch- und tierpathogenen Virusstämmen.
- 7) Im Brutei wurden auch Veränderungen in der Infektiosität und dem Tropismus der Viren und Mutationsbildungen festgestellt (17).

Das exembryonierte Brutei als Testobjekt für vermehrungshemmende und -fördernde Substanzen.

Die Feststellung, daß einige Virusarten sich am besten in den Zellen der Chorioallantoismembran vermehren, hat Bernkopf (1949) (5) veranlaßt, eine neue Züchtungsmethode zu entwickeln, bei der alle für die Virusmultiplikation unwesentlichen Gewebe des Embryos aus dem Brutei entfernt werden. Nur die an der Schalenhaut anhaftende Chorioallantoismembran wird im sonst leeren Ei belassen. Um die vom Kreislauf des Embryos abgeschnittenen Zellen möglichst lange zu ernähren und funktionstüchtig zu erhalten, wird das exembryonierte Brutei mit einer Nährflüssigkeit, der auch das Virus beigemischt ist, gefüllt und mit sterilen Gummikappen verschlossen und im Brutschrank bei 37°C weiterbebrütet. Die nach dieser Methode präparierten Eier stellen gewissermaßen ein von der Natur selbst geliefertes Kulturröhrchen für Viren dar. Um eine gute Bepflanzung mit Nährflüssigkeit und eine gute Belüftung der Membran zu gewährleisten, werden die Eier nach der in der Gewebezüchtung gebräuchlichen "Roller Tube Method" langsam gedreht. Durch die Drehung werden gleichzeitig auch die Stoffwechselprodukte aus der unmittelbaren Umgebung der Membran entfernt und die Zellen gleichmäßig mit Virus infiziert. Die Entnahme und Prüfung der in-

fixierten Nährflüssigkeit und die Zufuhr von Testsubstanzen ist bei dieser Methode relativ einfach zu handhaben.

Bisherige Ergebnisse

Bernkopf (5) untersuchte in seiner ersten Arbeit mit dieser Züchtungsmethode die Vermehrungsbedingungen des Influenzastammes A PR8. Er erhielt dabei die gleichen Vermehrungsergebnisse, wie sie bisher im intakten Brutei erzielt worden waren. Er findet gerade diese Methode für mehrere Anwendungsgebiete besonders günstig.

Einen ersten Vorteil sieht der Autor darin, daß wesentlich größere Mengen Infektionsmaterial verimpft werden können als bei den üblichen Bebrütungsmethoden. Er empfiehlt seine Züchtungsmethode auch zur Impfstoffgewinnung, weil die infizierte Nährflüssigkeit kein Eiweiß enthält. Ferner weist er darauf hin, daß durch die laufenden Entnahmen die Virusmengen besser bestimmt und die Charakteristik der Virusvermehrung in der Membran genauer studiert werden könne. Schließlich biete diese Methode auch viel günstigere Bedingungen zur Prüfung von virushemmenden und -fördernden Substanzen.

Die von Siegert und Mitarb. (74) mit dieser Methode bei der Züchtung des Influenza- und des Newcastlevirus gewonnenen Vermehrungsergebnisse lagen als Haemagglutinin-Endwerte im Durchschnitt ein bis zwei Stufen niedriger als die bei intakten Bruteiern erzielten Titer. Der Autor behauptet daher, daß die Vermehrungsbedingungen im exembryonierten Ei im allgemeinen ungünstiger sind als im intakten Brutei.

So gelang es ihnen auch nicht, unter den verschiedensten Versuchsbedingungen das Mumpsvirus mit dieser Methode zu züchten, obwohl Eaton (21) das Mumpsvirus im exembryonierten Brutei zur Vermehrung bringen konnte und es zu chemotherapeutischen Studien herangezogen hat.

Weiterhin untersuchte Siegert den Einfluß der Drehung auf den Verlauf der Haemagglutininintiter. Es wurde dabei festgestellt, daß der Adsorptionsvorgang durch die Drehung wesentlich gefördert wird. Infolge der durch die Drehung begünstigten Zellinfektion erscheinen die ersten neu gebildeten Haemagglutinine schon vier Stunden früher als in den nicht gedrehten Eiern. Auch die Endtiter, die annähernd mit den Kontrollen übereinstimmen, wurden frühzeitiger erreicht als in der ruhenden Kultur.

Bei Versuchen mit verschiedenen Infektionsdosen stellte der Autor fest, daß die Haemagglutinine den zu ihrem Nachweis erforderlichen Schwellenwert um so später erreichten, je geringer die Infektionsdosis war. Mit kleineren Infektionsdosen wurden jedoch schließlich höhere Endwerte erzielt als mit großen Virusmengen.

Ferner wurde die Abhängigkeit des Verlaufs der Haemagglutininintiter und des haemagglutininfreien Intervalls vom Zeitpunkt der Beimpfung untersucht. Der Versuchsablauf zeigt deutlich, daß das haemagglutininfreie Intervall in der Nährflüssigkeit um so länger dauert, je später die Eiinfektion durchgeführt wird. Wurde die Infektion erst 50 Stunden nach dem Exembryonieren der Eier durchgeführt, so betrug das Intervall das fünffache des Normalwertes frischer Membranen. Gleichzeitig zeigte sich aber ganz unerwartet, daß trotz zunehmendem haemagglutininfreien Intervall bei der Beimpfung innerhalb der ersten 20 Stunden der nachfolgende Titeranstieg der Haemagglutinine parallel erfolgt und schließlich ein ähnlicher Endtiter erreicht wurde wie nach Beimpfung frischer Membranen. Erst bei späteren Beimpfungen ist eine deutliche Abnahme im Steilheitsgrad der Kurve und der Endwerte festgestellt worden.

In einer späteren Arbeit (75) konnten Siegert und Mitarb. zeigen, daß die letztgenannten Ergebnisse mit dem Funktionszustand der Membranzellen zusammenhängen. So fand man, daß der Adsorptionsvorgang, also die physikalische Bindung der Haemagglutinine an die Zellrezeptoren, unabhängig vom jeweiligen Funktionszustand der Zelle abläuft und somit immer gleichbleibt. Dagegen zeigte das durch die zunehmend ungünstigeren Vermehrungsbedingungen auch entsprechend verlängerte haemagglutininfreie Intervall, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Titeranstiegs und den Zellfunktionen bestehen muß. Eine Kurve über den O_2 -Verbrauch der Chorioallantoismembranen verdeutlicht noch diese Feststellung. Schon nach 26-stündiger Lagerung in Tyrodelösung war die Zellatmung bereits auf 50 % ihres Ausgangswertes abgesunken. Demnach verschlechtern sich die Vermehrungsbedingungen des Virus mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Exembryonierung relativ schnell. Der unerwarteterweise gleichgebliebene Steilheitsgrad im Anstieg der Haemagglutinine läßt darauf schließen, daß auch bei verlängertem haemagglutininfreien Intervall von der Wirtszelle noch eine ähnliche Zahl von Haemagglutininen in der gleichen Zeiteinheit abgegeben werden kann wie von frischen Membranzellen (75).

Die meisten Kurven des Haemagglutinin-titer-Anstiegs in den von Siegert erschienenen Arbeiten über die Vermehrung von Viren im exembryonierten Brutei zeigen einen stufenförmigen Verlauf (74,75).

Schäfer und Munk (67) haben einen derartigen stufenförmigen Verlauf in noch ausgeprägterem Maße bei den Viren der klassischen Geflügelpest beobachtet.

Mit der Verwendbarkeit des exembryonierten Bruteis zur Austestung virostatistischer und viruzider Mittel hat sich besonders Sprössig beschäftigt.

In einer Arbeit über die Austestung virusinaktivierender Eigenschaften von Desinfektionsmitteln im exembryonierten Ei weist er auf die Vorzüge dieser Methode für derartige Versuche hin (78).

Er fand, daß sich durch das Arbeiten mit dem exembryonierten Brutei eine quantitative Erfassung von AO (atypischer Geflügelpest, Newcastle Disease) und Influenzaviren verhältnismäßig einfach und übersichtlich gestaltet (80). Die Zahl der noch aktiven Elementarkörperchen läßt sich am zeitlichen Auftreten der ersten Haemagglutinationstiter im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen in brauchbarer Weise ablesen. Mit nur wenigen Eiern kann die für einen Vergleich erforderliche größere Zahl von Desinfektionsmitteln auf rationellem Wege überprüft werden. Die hohe Empfänglichkeit der Chorioallantois im exembryonierten Ei erlaubt ohne größere individuelle Schwankungen die graduelle Auswertung so geringer Infektionsdosen, daß eine nachteilige Interferenz (8,33,57,49) der Viren durch inkomplette Elementarkörperchen sicher ausgeschaltet werden kann. Die Abnahme der infektiösen Elementarkörperchen nach der Einwirkung chemischer Substanzen läßt sich an der Verlängerung der haemagglutininfreien Phase quantitativ gut ablesen. Die Auswertung dieser Zeit als Funktion erspart das übliche Verimpfen mehrerer Verdünnungsstufen auf eine beachtliche Menge von intakten Bruteiern oder Versuchstieren. Dadurch wird es möglich, mit äußerst geringem Materialaufwand in kürzerer Zeit eine größere Zahl handelsüblicher Desinfektionsmittel in ihrer viruziden Wirkung vergleichbar auszutesten. Die hohe Empfänglichkeit der Allantoiszellen erlaubt das Herabsetzen der Impfdosis in so hohem Maße, daß eine Schädigung der Wirtszellen durch Spuren übertragener Desinfektionsmittel zu vermeiden ist. Da jedes exembryonierte Ei bequem 20 ml Impfmateriale aufnehmen vermag, kann die Prüfung der sonst üblichen geringen Stichproben in einem beträchtlichen Umfang überschritten werden. Das führt zum Nachweis auch ganz vereinzelter infektiöser Elementarkörperchen und damit zu äußerst differenzierten Wertbestimmungen der inaktivierenden Substanzen.

So untersuchte Sprössig im exembryonierten Brutei den Einfluß des aus der Kapuzinerkresse isolierten, mit dem H-Benzylsenföhl identischen Wirkstoffes auf die Vermehrung der Influenzaviren (79). Er stellte fest, daß der Wirkstoff nicht in der Lage ist, das Virus selbst zu inaktivieren. Obwohl es zu einem Sistieren der Virusproduktion kam, zeigten Versuche im Warburg-Apparat, daß dies auf eine deutliche Schädigung der Zellatmung zurückzuführen war.

Der Autor folgert daraus, daß auch dieses Medikament nicht in die Reihe der Antibiotika eingeordnet werden kann. Es handele sich um eine Substanz, die den Zellstoffwechsel des Makroorganismus bereits bei geringer Dosierung nachteilig beeinflusse, ohne den Krankheitserreger selbst zu schädigen.

Bei der Austestung virusinaktivierender Eigenschaften von Desinfektionsmitteln im exembryonierten Brutei wurde Sprössig besonders auf die starke inaktivierende Wirkung von Propylalkohol aufmerksam (78). Mit einer 30%igen Lösung dieser Substanz wurde ein Grad der Inaktivierung gegenüber AP und Influenzaviren erreicht, der als imponierend bezeichnet werden muß. Bei der unsuldlänglichen Wirkung der üblichen Desinfektionsmittel gegenüber Viren verdient diese Erkenntnis besondere Aufmerksamkeit.

Eigene Untersuchungen

Da die bisherigen Anwendungsmöglichkeiten und Vermehrungsbedingungen im exembryonierten Brutei zu zum Teil unbefriedigenden Ergebnissen führten und zudem das Exembryonierungsverfahren selbst einige Schwierigkeiten in der Durchführung aufweist, haben wir uns der Frage zugewandt, auf welche Weise eine optimale Virusmultiplikation erzielt werden kann.

Die Grundlage für unsere Versuche mit dem exembryonierten Brutei bildeten 2 Fragen:

1. Läßt sich das Exembryonierungsverfahren selbst noch weiter verbessern?
2. Bestehen Möglichkeiten, durch eine Veränderung des Nährsubstrates die Virusmultiplikation zu fördern?

Versuchsgruppe I

Ein beachtenswerter Nachteil des Exembryonierungsverfahrens besteht darin, daß sich die Membranen oft schon nach kurzer Zeit ablösen und zusammengeknäult in der Nährflüssigkeit herumschwimmen. Diese Membranablösung beeinträchtigt aber das Züchtungsergebnis sehr stark. Der größte Teil der Zellen fällt für die Virusvermehrung aus, weil einmal die Adsorptionsfläche für die Viren wesentlich kleiner wird und auch andererseits viel schlechtere Ernährungsverhältnisse vorliegen, sodaß die Membranzellen vorzeitig absterben. Die vorzeitige Ablösung wird noch durch die Rotation der Eier auf der Drehscheibe gefördert.

Siegert versuchte das sich ablösende Gewebe nach dem Vorbild der "Roller Tube Method" mit Hühnerplasma wieder anzukleben (74). Jedoch hatte dieser Versuch im exembryonierten Ei keinen Erfolg.

Schäfer und Munk (67) empfehlen statt der Rotation ein gelindes Schütteln der Eier vorzunehmen. Wir haben dies ebenfalls mehrmals versucht, indem wir die stehenden exembryonierten Eier in kurzen Abständen sachte schüttelten. Aber auch hierbei kam es zu zahlreichen Membranablösungen.

Ein vorzeitiges Ablösen der Membranen wird wohl niemals gänzlich zu vermeiden sein, doch können wir auf Grund unserer eigenen Versuche folgendes empfehlen:

Für wichtig halten wir einmal die Bebrütungszeit, nach der die Exembryonierung vorgenommen wird, also das Alter der Bruteier. Vor dem 14. Bebrütungstag ist die Verbindung des Dottersackes mit der Chorioallantoismembran in der Nähe des spitzen Eipoles noch so groß, daß beim Herauslösen des Embryos oft pfennigstückgroße Defekte entstehen, von denen aus sich entweder beim Ausspülen oder bei der Rotation, Luft oder Flüssigkeit zwischen die Kalkschale und die Chorioallantoismembran zwängt und die Membran vorzeitig zur Ablösung bringen. Diese Verbindungsfläche wird mit zunehmendem Alter der Bruteier immer kleiner.

Andererseits stellten wir fest, daß bei einer Bebrütungszeit von mehr als 15 Tagen die Membranen sich auch häufiger ablösen, wohl deshalb, weil keine so innige Verbindung oder Haftung mehr zwischen der Chorioallantoismembran und der Kalkschale besteht. Eine 14 Tage lange Bebrütung halten wir daher für die Exembryonierung am günstigsten.

Die vorzeitige Membranablösung kann ebenso weitgehend verhindert werden durch eine möglichst schonende Exembryonierung. Eine weitere Hilfe bedeutet das von Siegert angegebene Anheften der Schalenhaut mit flüssigem Paraffin (74). Danach wird nach Abtragen des stumpfen Eipoles die an der Luftkammerbasis freiliegende Schalenhaut und der noch überstehende innere Schalenrand sorgfältig mit heißem Paraffin überzogen. Erst nach Erhärten desselben schneidet man eine runde weite Öffnung aus der Schalenhaut und der darunter anliegenden Chorioallantoismembran heraus. Hierdurch soll verhindert werden, daß die Chorioallantoismembran bei der Entfernung des Embryos aus der Schale herausgleitet. Eine Ablösung an diesem mit gehörtetem Paraffin befestigten Schnittrand konnten wir kaum noch feststellen.

Um auch ein Ablösen der Membran am spitzen Eipol zu verhindern, legten wir eine sterile quadratische Glasplatte von 2 cm Seitenlänge und 0,5 cm Dicke in das exembryonierte Ei ein. Dadurch wurde die Chorioallantoismembran genügend fixiert, ohne daß die darunter liegende Membran für die Vermehrung ausfiel, denn durch die quadratische Form der Glasplatte wird der spitze Eipol nicht völlig abgeschlossen. Die darunter liegende Membran konnte weiterhin mit der Nährlösung gespült und infiziert werden (siehe Schema).

Ein weiterer Vorteil dieser eingelegten Glasplatte ist eine leichtere Entnahmemöglichkeit der zu prüfenden Flüssigkeit mit Hilfe der Kapillarpipette. Das sonst oft so störende Ansaugen der Membran mit der Pipette (wohl auch ein häufiger Grund für die vorzeitige Ablösung) ist dadurch nicht mehr möglich.

Bei dieser beidpoligen Befestigung der Chorioallantoismembran ist auch ein teilweises Abheben der seitlichen Membran, wie es noch manchmal beobachtet wurde, für die Virusvermehrung und die Entnahmetechnik bedeutungslos.

Versuchsgruppe II

Material und Methoden

Exembryonierungsverfahren (siehe auch (74)).

Am besten verwendet man 14 Tage alte, bei 37°C vorbebrütete, befruchtete Hühner-eier.

Bei einer vorherigen Durchleuchtung wird der untere Rand der Luftkammer mit einem Bleistift auf der Eischale markiert. Vor Beginn der Exembryonierung wird die äußere Schale mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Anschließend wird die

- a Kalkschale
- b Schalenhaut
- c Chorioallantoismembran
- d Paraffinbefestigung
- e Glasplatte
- f Gummikappe
- g Glasröhre
- h Kapillarpipette

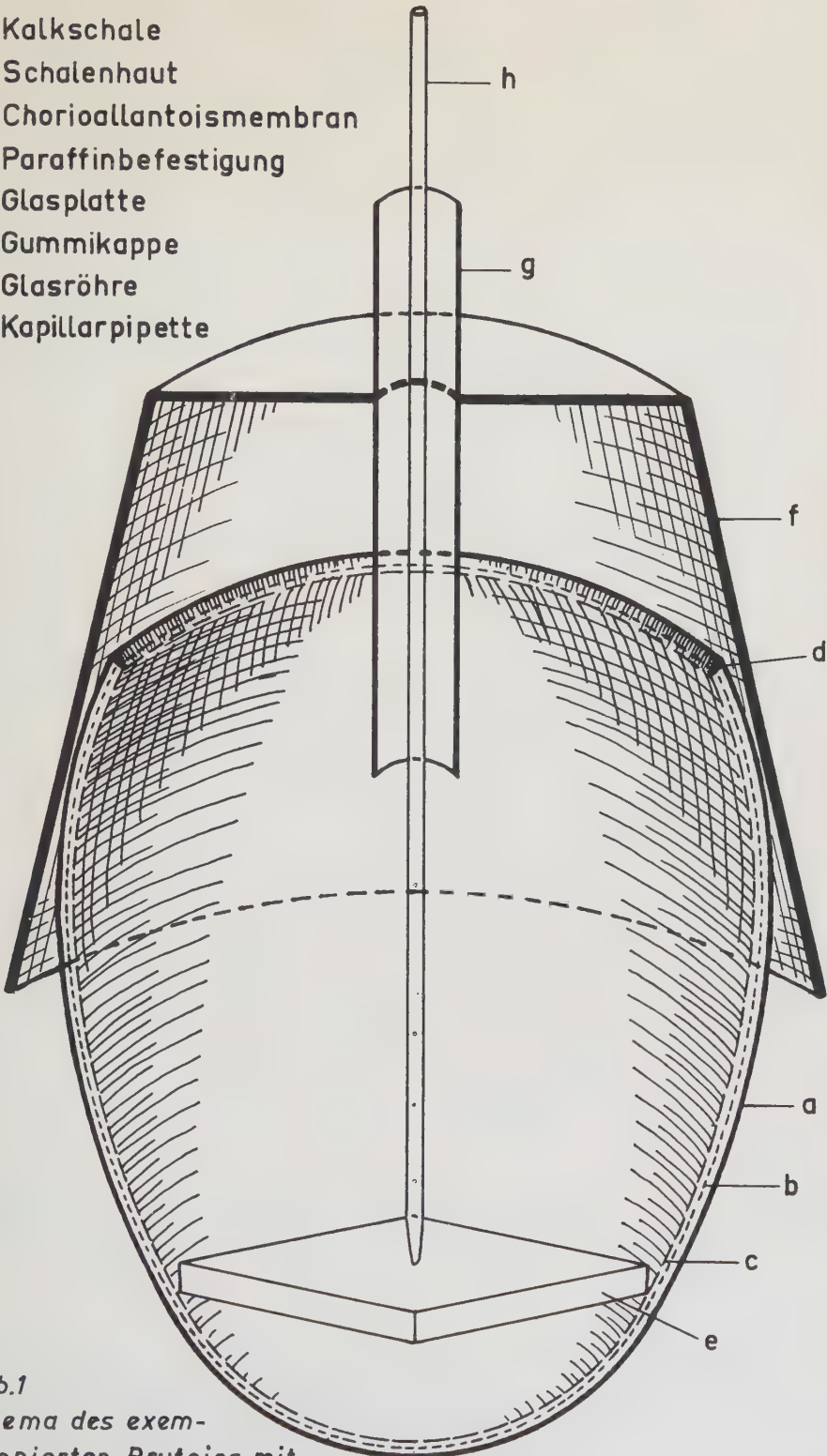


Abb.1

Schema des embryonierten Bruteies mit
Darstellung der beidpoligen Befestigung der Chorioallantoismembran.

Schale über der Luftkammer bis etwas unterhalb der Markierungslinie mit flüssigem Paraffin übersogen. Jetzt kann man, ohne daß die Schale splittert, den stumpfen Pol des Eis 2 - 3 mm oberhalb der Markierungslinie mit einer sterilen gebogenen Schere abschneiden. Die an der Luftkammerbasis freiliegende Schalenhaut und der noch überstehende innere Schalenrand werden nun sorgfältig mit heissem Paraffin übersogen. Nach dessen Erhärten schneidet man eine runde weite Öffnung aus der Schalenhaut und der darunter liegenden Chorioallantoismembran heraus, von denen nur der schmale fixierte Rand an der Schalenwand zurückbleibt. Den Embryo mit Dotter- und Amnionsack sowie der Eiweißkammer läßt man dann unter drehenden Bewegungen des Eis auslaufen, wobei man alle Verbindungen zur Chorioallantoismembran vorsichtig mit der Schere durchtrennt. Als einziger Teil des Embryos verbleibt die Chorioallantoismembran in der Eischale zurück. Das Innere des Eis wird dann mehrmals mit kühler, steriler physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, um alle noch darin verbliebenen Reste von Dotter, Eiweiß und Blut zu entfernen. Anschließend stellt man die leeren Eier kurze Zeit zum Auslaufen der Spülflüssigkeit, in eine sterile Petrischale. Nachdem dann in jedes Ei eine sterile quadratische Glasplatte eingelegt wurde, wurden die Eier mit je 20 ccm Hankslösung gefüllt. Um ein Bakterienwachstum auszuschalten, werden außerdem noch 150 IE Penicillin und 50 μ Streptomycin pro ml Nährlösung hinzugegeben. Hierauf wird die Schalenöffnung mit einer sterilen Gummikappe verschlossen. Der Rand der Gummikappen wird zuvor noch in heißes Paraffin getaucht, um einen dichteren Abschluß zu gewährleisten. Um für eine gleichmäßige Bepflanzung mit infizierter Nährlösung und eine gute Belüftung der Chorioallantois zu sorgen, erfolgte die Befestigung auf einer um 45 Grad geneigten Scheibe, die durch einen Motor etwa 15 Umdrehungen in der Stunde ertuhr. Die Versuche liefen im Brutschrank bei den gewünschten Temperaturen ab.

Infektionsmaterial

Zur Untersuchung wurden die Influenzastämme A (PR8) und B (Lee) herangezogen. Die mit diesen Virusstämmen infizierte frisch entnommene Allantoisflüssigkeit wurde zur Beseitigung grober Gewebepartikel 10 min bei 3500 UpM zentrifugiert und anschließend mit Hankslösung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Zu diesem Gemisch kamen dann noch 150 IE Penicillin und 50 μ Streptomycin/ml hinzu. Jedes exembryonierete Ei wurde mit 20 ml infizierter Nährlösung beschickt. Bei einer Temperatur von 37°C für den Influenzastamm A (PR8) und 35°C für den Stamm B (Lee) wurden die Eier im Brutschrank nachbebrütet.

Der pH-Wert der infizierten Nährlösung lag immer um 7,5.

Haemagglutinationsnachweis

Durch die mit einem Glasrohr durchbohrten Gummikappen wurde den exembryonierten Eiern mit einer graduierten Kapillarpipette in bestimmten Zeitabständen je 0,5 ml Nährlösung entnommen und durch geometrische Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung (1:2; 1:4 usw.) der Haemagglutinationstiter nach Hirst bestimmt. Zu je 0,5 ccm der einzelnen Verdünnungsstufen kamen 0,5 ml einer frisch hergestellten im Verhältnis 1:200 verdünnten Aufschwemmung von Hühnererythrocyten. Die Testreihen blieben bei Zimmertemperatur eine Stunde stehen. Als Endtiter sind die reziproken Werte der jeweiligen Verdünnung angegeben, bei der eine Agglutination noch makroskopisch zu erkennen war. Die kurvenmässige Aufzeichnung dieser Titer über 48 Stunden gibt einen gewissen Anhalt für die Virusvermehrung. Ihre Veränderung durch die Einwirkung einer Testsubstanz lässt sich im Vergleich zur unbeeinflussten Vermehrungskontrolle ablesen.

Nährsubstrat

Aus der großen Anzahl von Veränderungsmöglichkeiten des Nährsubstrates wählten wir 2 Möglichkeiten aus, die uns in Bezug auf ihre Durchführbarkeit und Wirkungsweise besonders günstig erschienen. Wir dachten in erster Linie daran, über eine Verbesserung des Stoffwechsels und der Funktion der Membranzellen eine Einwirkung auf die Virusvermehrung zu erzielen.

a) Synthetisches Nährmedium

Wir verwendeten ein von den Behring-Werken (Marburg) hergestelltes synthetisches Nährmedium, das als Nährlösung für animale Zellen in Gewebekulturen von Morgan, Morton und Parker (59) entwickelt wurde. Dieses Medium ist auch unter der Bezeichnung T.C.M. 799 (Tissue Culture Medium) bekannt. Es kann in stets gleichbleibender Qualität hergestellt werden. Das synthetische Nährmedium ist eiweißfrei und enthält in chemisch genau definierten Verbindungen die für das Zellwachstum notwendigen Baustoffe in günstiger Konzentration.

Von den zahlreichen chemischen Bestandteilen dieser Nährlösung seien hier

nur einige Hauptbestandteile angeführt, die sowohl für die Zellfunktion als auch für die Virusmultiplikation von Bedeutung sind.

T.C.M. 199 enthält in der Hauptsache Aminosäuren. Davon stehen quantitativ an der Spitze:

Glutaminsäure	150	Arginin	70
Leucin	120	Threonin	60
Lysin	70	Asparaginsäure	60
Alanin	50	Glutamin	100
Dextrose	1 g		

Auch Ribose und Desoxyribose als Bausteine der Nucleinsäuren sind in dem Nährmedium enthalten. Außerdem enthält es noch zahlreiche Vitamine. Der pH-Wert des Nährmediums liegt bei 7,3.

Rhodes, Wood und Duncan (66) stellten fest, daß ein synthetisches Nährmedium mit bekannter chemischer Zusammensetzung viele Vorteile gegenüber einem Serum-Ultrafiltrat hat, dessen Zusammensetzung oft ganz erheblich schwankt. Sie berichten auch, daß das T.C.M. 199 bei der Züchtung des Lansing Stammes von Polioviren in Gewebekulturen der Hanks-Nährlösung weit überlegen ist.

In unseren Versuchen haben wir das T.C.M. 199 der Hankslösung im Verhältnis 1:50; 1:20 und 1:10 zugesetzt.

b) Embryonenstücke

Wir verwendeten hierzu die Embryonen aus den exembryonierten Eiern. Diese wurden, nachdem die Verbindung zum Dottersack durchtrennt und auch das Amnion entfernt war, mehrmals in steriler, physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend mit einer sterilen Schere in mehrere Stücke zerschnitten. Die Embryonenteile wurden dann der Hankslösung in den exembryonierten Eiern zugegeben.

Durch die Embryonenstücke glaubten wir einmal das Nährsubstrat zu verbessern, zum andern dachten wir auch an günstige hormonale Einflüsse auf den Zellstoffwechsel, um dadurch eine Steigerung der Funktion der Membranzellen und somit der Virusvermehrung herbeizuführen.

Versuchsanordnung und Ergebnisse

In unserem ersten Versuch verwandten wir 3 Gruppen von je 5 Eiern, die nach der Exembryonierung mit je 20 ml steriler Hankslösung gefüllt wurden. Die Nährlösung wurde im Verhältnis 1:100 mit einer B (Lee) Virussuspension (Allantioflüssigkeit, Haemagglutinationstiter 160) verdünnt.

Die infizierte Nährlösung wies noch einen geringen Infektionstiter von 4 auf. Die Kontrollgruppe enthielt nur die infizierte Hankslösung. In der zweiten Gruppe war der Hankslösung noch das synthetische Nährmedium T.C.M. 199 in einer Verdünnung von 1:50 hinzugefügt, den 5 exembryonierten Eiern der dritten Gruppe wurden in die infizierte Hankslösung mehrere Stücke von 14 Tage alten Hühnerembryonen zugefügt.

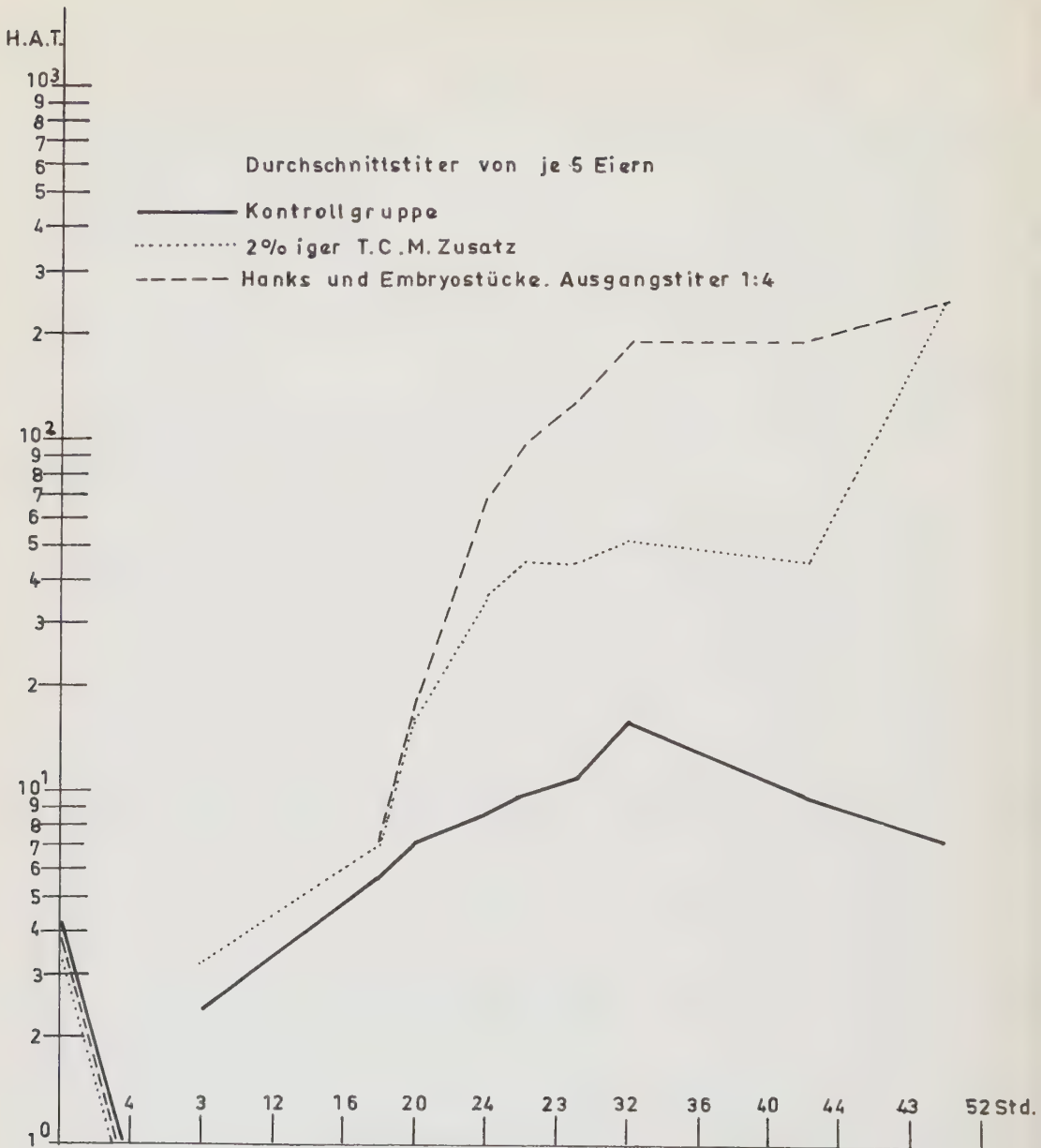
Je einem Kubikzentimeter der Nährlösung waren vorher 150 IE Penicillin und 50 µ Streptomycin zwecks Vermeidung bakterieller Superinfektionen zugesetzt worden.

Die mit Gummikappen verschlossenen und auf dem Rotator befestigten Eier wurden im Brutschrank konstant auf einer Temperatur von 35°C gehalten. Über einen Zeitraum von 50 Stunden wurde in bestimmten Abständen aus jedem Ei 0,5 ml Testflüssigkeit entnommen und die Haemagglutinationstiter nach der oben beschriebenen Methode von Hirst bestimmt. Wir stellten für jede entnommene Hankslösung den jeweiligen Studententiter und anschließenden Mittelwert der Einzeltiter jedes Kollektivs fest. Nur die letzteren wurden tabellarisch erfaßt und auf den Kurven eingetragen.

Die Ergebnisse des ersten Versuches sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

Die vier Phasen der Virusvermehrung, wie sie bei den Phagen und den verschiedenen menschen- und tierpathogenen Viren beobachtet wurden (18), stimmen auch im wesentlichen mit dem Vermehrungsablauf des Influenzavirus in der Chorionallantoismembran des exembryonierten Brutels überein. Der Vermehrungsvorgang beginnt mit der Infektionsphase, auch Adsorptionsphase genannt, in der die Viren an der Oberfläche der Wirtszellen physikalisch gebunden werden. Diese Phase war in unserem Versuch nach 2 - 3 Stunden abgeschlossen. In der sich anschließenden Latenzphase entziehen sich die Viren dem haemagglutinatorischen Nachweis, weil sie beim Durchwandern der Membran zerfallen und sich weder serologisch noch biologisch oder morphologisch nachweisen lassen. Ein Nachweis von Agglutinationen in der Nährflüssigkeit war bei den ersten beiden Gruppen 6 Stunden lang

Abb. 2



Haemagglutinintiteranstieg bei verschiedenem Nährsubstrat im
 exembryonierten Ei

nicht möglich, während das haemagglutininfreie Intervall in der dritten Gruppe über 10 Stunden betrug. Der darauf folgende Anstieg der Haemagglutinine in der Nährlösung war in den einzelnen Untersuchungsgruppen unterschiedlich.

Während der Anstieg der Agglutinine in der Kontrollgruppe nur zögernd erfolgte und schon nach 32 Stunden einen nicht sehr hohen Maximaldurchschnittswert aufwies, war der geometrische Haemagglutinationsanstieg in den beiden Testgruppen einmal viel steiler, zum andern liegen auch die Durchschnittswerte wesentlich über denen der Kontrolle.

Der Durchschnittswert der T.C.M.-Gruppe liegt schon nach 8 Stunden über dem der Kontrolle. Dieser Unterschied wird ab der 18. Nachbebrütungsstunde noch wesentlich deutlicher. Ein erster Maximalwert liegt auch bei 32 Stunden. Dann kommt es über mehrere Stunden zu einer Plateaubildung, doch anschließend erfolgt wieder ein steiler Anstieg bis zum endgültigen Maximum. Im Durchschnitt liegen die Stundentiter der T.C.M.-Gruppe doppelt so hoch als die Durchschnittstiter der Kontrollgruppe.

Die Darstellung des Haemagglutininintiteranstiegs in der Gruppe mit den Embryonenstücken ist den anderen beiden Kurven nicht gleichzustellen, weil es sich hier um einen Durchschnittswert von nur 2 Eiern handelt. In 2 Eiern dieser Gruppe zeigte sich während der gesamten Untersuchungsdauer von 50 Stunden überhaupt keine Vermehrung, während ein Ei nur zwischen der 26. und 42. Stunde einen geringen Haemagglutininintiter aufwies.

In den beiden Eiern, in denen eine starke Virusvermehrung stattfand, war die Latenzphase wesentlich verlängert. Erst nach 15 Stunden kam es zu einem steilen geometrischen Anstieg. Nach 32 Stunden kam es zu einer Plateaubildung. Der Maximalwert wurde jedoch auch erst nach 50 Stunden erreicht, der dem Maximum der T.C.M.-Gruppe entspricht.

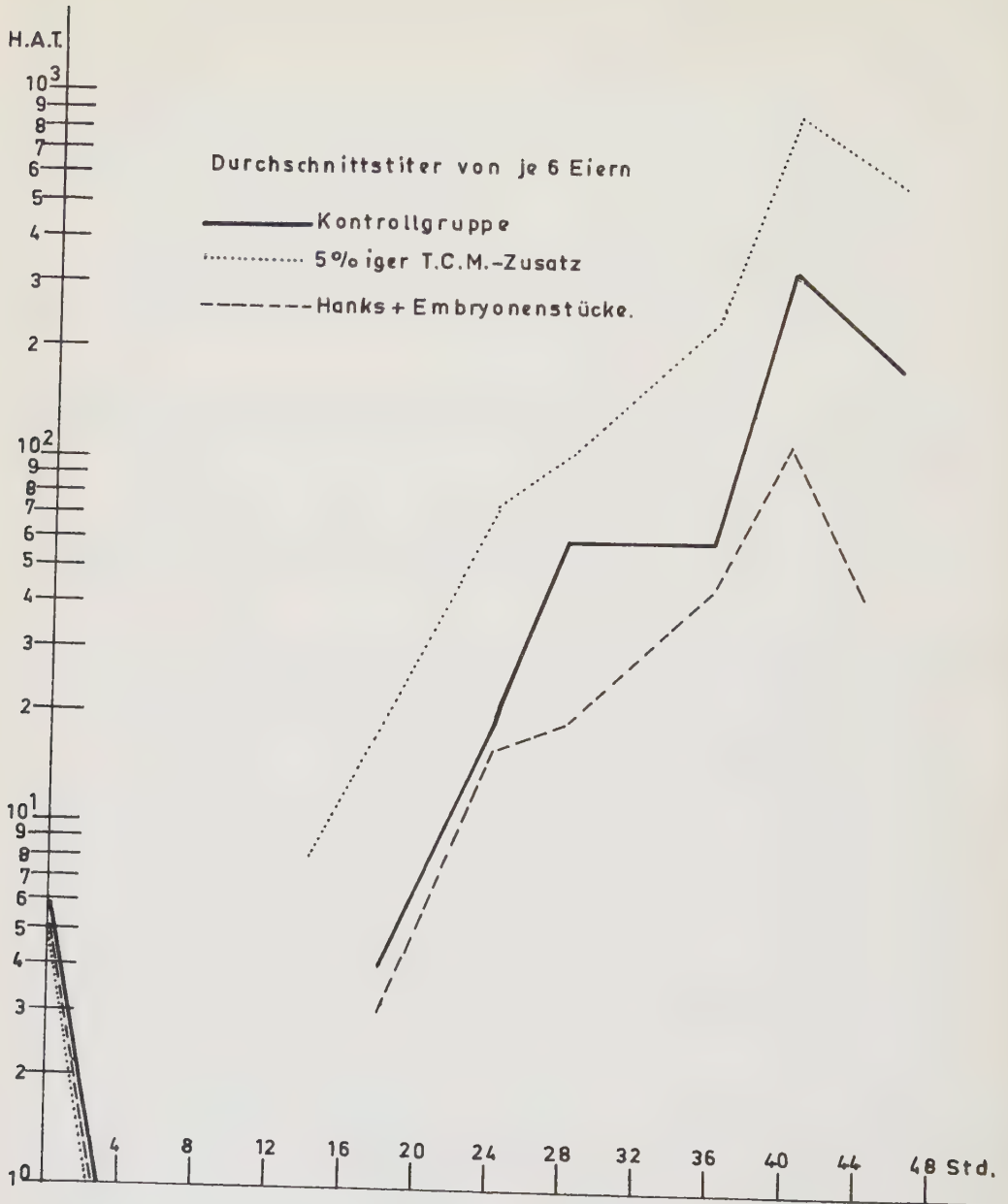
Bei der nachträglichen Untersuchung der Embryonenstücke in den Eiern dieser Gruppe fanden sich nur bei den beiden Eiern, in deren Nährflüssigkeit sich eine größere Menge von Haemagglutininen nachweisen ließ, Teile des embryonalen Abdomens mit den großen Verdauungsdrüsen Leber und Pankreas, außerdem Milz und Nieren.

Am wahrscheinlichsten geht diese Wirkung von der Leber aus, da diese viele, für den Zellstoffwechsel wichtige Fermente und Nährstoffe enthält. Auch an eine hormonale Wirkung kann gedacht werden. Wir wissen, daß viele Steroidhormone nach Leberpassage ihre Wirkung ändern, z.T. unter einer Wirkungssteigerung z. B. bei manchen Corticosteroiden; z.T. unter Wirkungsverlust bei den Sexualhormonen. Nach Leberdurchströmung mit Nebennierenrindenhormonen entstehen z. T. Substanzen mit veränderter Wirkungsqualität (89).

Ein zweiter Versuch mit den gleichen Testgruppen sollte die gewonnenen Ergebnisse bestätigen. Die Versuchsanordnung war wieder die gleiche, nur wurde diesmal als Infektionsagens eine frisch entnommene, mit dem Influenzastamm B (Lee) infizierte Allantoisflüssigkeit benutzt. Die Eier, die zur Gewinnung der Infektionsflüssigkeit gebraucht wurden, waren nach 10 Tagen Bebrütungszeit mit B (Lee) infiziert worden. Nach einer weiteren Bebrütungsdauer von 40 Stunden wurde die Infektionsflüssigkeit gewonnen. Der Titer betrug 1:5096. Nach einer Verdünnung von 1:100 mit der Hanksnährlösung fand sich bei dieser noch ein geringer Titer von 1:8. Es wurde mit Kollektiven von je 6 Eiern gearbeitet. Die Kontrollgruppe enthielt je Ei 20 ml infizierte Hankslösung. Die Eier des zweiten Kollektivs enthielten noch zusätzlich das T.C.M. 199 diesmal in einem Verhältnis von 1:20. Den Eiern der dritten Gruppe waren wieder Embryonenstücke zugegeben worden.

Die Darstellung der Haemagglutininvermehrung in den einzelnen Gruppen ist in Abb. 3 wiedergegeben. Nach 4 Stunden waren alle Viren an die Rezeptoren der Membranellen gebunden und somit nicht mehr nachweisbar. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit den Embryonenstücken betrug das haemagglutininfreie Intervall 14 Stunden. Dagegen war diese Zeitspanne bei dem Kollektiv mit 5 % igem T.C.M.-Nährmedium um mindestens 4 Stunden verkürzt. Die erste Phase der Haemagglutininintiter-Zunahme erfolgte beim Kontrollwert sehr steil bis zum 28-Stunden-Wert. Dann zeigt die Kurve über 8 Stunden eine Plateaubildung und anschließend wiederum einen steilen Anstieg bis zum Maximalwert, der nach 40 Stunden erreicht wurde. Außer der Verkürzung der Latenzphase um 4 Stunden, war in der T.C.M.-Gruppe auch eine deutliche Erhöhung der Einzeldurchschnittswerte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollwerten festzustellen. Zunächst kommt es auch zu einem steilen geometrischen Anstieg. Nach 10 Stunden nimmt der Steilheitsgrad etwas ab, um dann nach weiteren 12 Stunden wieder den anfänglichen Steilheitsgrad anzunehmen. Die Einzeldurchschnittstiter des T.C.M.-Kollektivs lagen wieder durchschnittlich doppelt so hoch als die der Kon-

Abb.3



Haemagglutinationstiteranstieg bei verschiedenem Nährsubstrat

trollgruppe. Das Maximum wurde ebenfalls nach 40 Stunden erreicht. Es war fast dreimal so hoch wie das Maximum der Kontrolle.

In der Gruppe mit den Embryonenstücken fand diesmal in allen Eiern eine Virusvermehrung statt. Jedoch liegen die Durchschnittstitern bei diesem Versuch unter denen der Kontrolle. Der Haemagglutinititeranstieg in den ersten 6 Stunden ist noch ungefähr mit den Kontrollwerten identisch. Dann kommt es zu einem deutlichen Abflachen der Kurve, die über 12 Stunden anhält. Ein kürzer steiler Anstieg führt dann zum Maximalwert, der ebenfalls nach 40 Stunden erreicht wird. Die Einzeldurchschnittswerte liegen von der 24. Stunde an deutlich unter denen der Kontrolle. Alle Eier dieser Gruppe enthielten diesmal Teile des Abdomens, des Thorax und der Extremitäten. Die Köpfe der Embryonen waren nicht hinzugefügt worden. Eine genaue Trennung nach einzelnen Organen war nicht durchgeführt worden.

In beiden Versuchen zeigten sich deutlich verbesserte Vermehrungsbedingungen für die Influenzaviren des B (Lee) Stammes nach Zusatz des synthetischen Nährmediums T.C.M. 199 zur Hankslösung. Diese Vermehrungssteigerung kann als signifikant bezeichnet werden (30).

Die Ausgangsbedingungen für die Virusvermehrung im exembryonierten Brutei werden also durch das synthetische Nährmedium wesentlich gebessert. Die in diesem Medium enthaltenen wichtigen Bausteine und Fermente der Zelle gewährleisten eine optimale Funktion und Stoffwechselleistung der Zelle. Gleichzeitig enthält das Medium aber auch die meisten chemischen Bestandteile des Virus selbst in einer günstigen Konzentration. So ist durch die intensivierte Stoffwechseltätigkeit der Membranzellen nicht nur eine Steigerung der Virusvermehrung, sondern auch eine Beschleunigung (Verkürzung der Latenzphase) der Multiplikation möglich.

In unseren weiteren Versuchen haben wir auf eine Verwendung von Embryonenstücken als Nährsubstrat verzichtet. In erster Linie deshalb, weil die Entnahme der Testflüssigkeit mit zunehmender Versuchsdauer immer schwieriger wurde. Die Embryonenstücke legten sich beim Ansaugen der Flüssigkeit vor die Öffnung der Kapillarpipette, oder kleinere Stücke verstopften diese völlig, was einmal die Entnahmekzeit wesentlich verlängerte, aber auch Schwierigkeiten beim Pipettieren in den Verdünnungsreihen machte. Die Ergebnisse dieser Gruppe im ersten Versuch verlangen noch eine genauere Überprüfung. Vielleicht läßt sich durch eine Verwendung der gewünschten Organextrakte die Entnahmetechnik verbessern.

Der stufenförmige Verlauf oder der "Knick" in den Kurven des Haemagglutinititer-Anstiegs, wie er von Schäfer und Munk (67) und in den von Siebert (74) erschienenen Arbeiten über die Virusvermehrung im exembryonierten Brutei beschrieben wurde, konnte auch in unseren Versuchen festgestellt werden. Im intakten Brutei wurde von Green und Freyman (34) ebenfalls eine Plateaubildung in den Vermehrungskurven von Influenzaviren festgestellt. In den uns bekannten Arbeiten fand sich bisher keine Erklärung für dieses Phänomen.

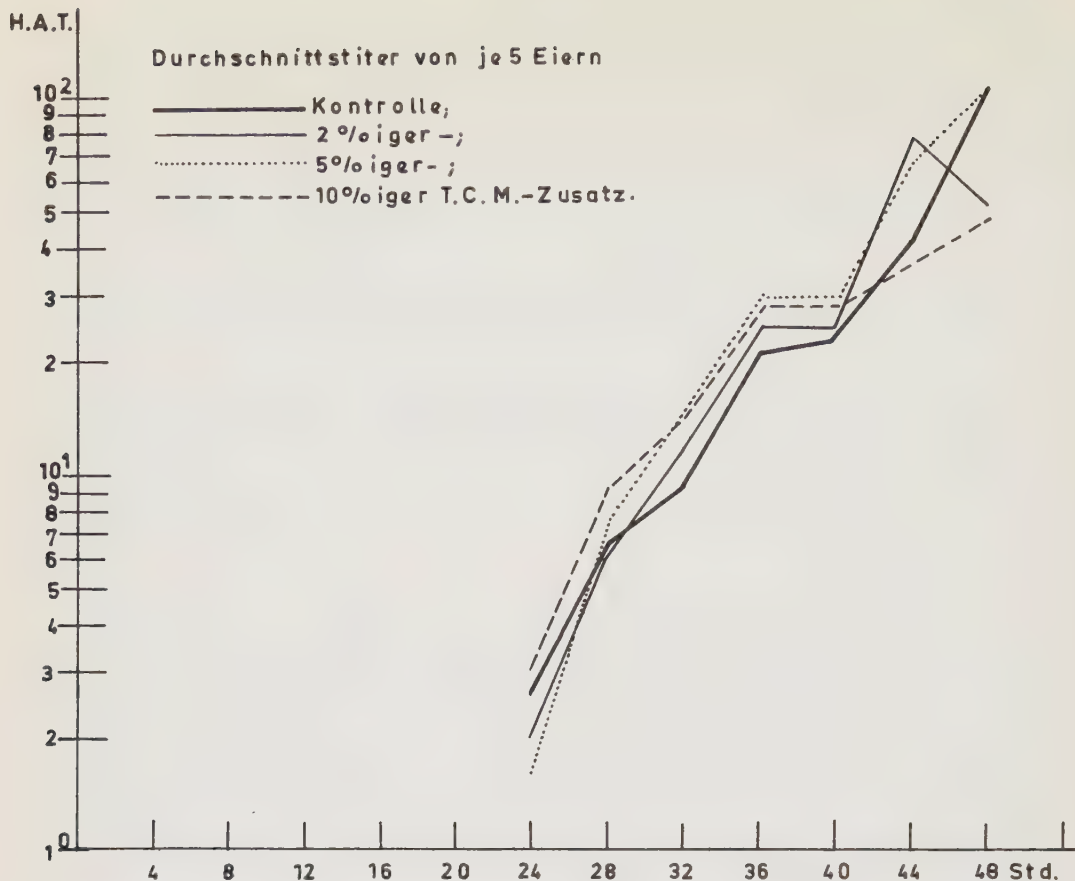
Wir glauben, daß dieses Phänomen durch ein erneutes Adsorptionsstadium und eine darauf folgende Latenzphase hervorgerufen wird. Dieses zweite Adsorptionsstadium wird möglich, nachdem die oberflächliche Zellschicht der Chorioallantoismembran nach einer bestimmten Zeit weitgehend durch die Virusvermehrung zerstört ist. Die Rezeptoren der darunter liegenden Zellen vermögen nun einen bestimmten Teil der Viren physikalisch zu binden, die natürlich in der Latenzphase in der Nährflüssigkeit nicht nachzuweisen sind und so den Stillstand oder die Abflachung des Kurvenanstiegs bewirken.

Die Darstellung in Abb. 3 zeigt, daß die Zeit vom Beginn der Abknickung oder Plateaubildung bis zum erneuten steileren Anstieg der Kurve, dem Zeitraum des vorausgegangenen ersten haemagglutininfreien Intervall ungefähr entspricht.

Der Klärung der Frage, bei welcher Konzentration von T.C.M.-Nährsubstrat in der Hankslösung die maximale Virusbeute liegt, diene ein weiterer Versuch.

Zwanzig 14 Tage lang bebrütete Hühnereier wurden nach der angegebenen Methode exembryoniert und in 4 gleiche Gruppen aufgeteilt. Die Hankslösung wurde in der üblichen Weise hergestellt und sterilisiert. Zur Infektion wurde frisch entnommene Allantoisflüssigkeit benutzt, deren Infektionstitern sehr niedrig (1:16; 1:32) waren. Die im Verhältnis 1:100 infizierte Hankslösung wies keinen Haemagglutinititer auf. Die ersten 5 Eier enthielten nur infizierte Hankslösung und dienten der Kontrolle. Die zweite Gruppe enthielt einen 2 %igen, die dritte einen 5 %igen und die vierte Gruppe einen 10 %igen Zusatz von T. C. M. 199. Das Nährmedium in noch höherem Prozentsatz zuzugeben, würde die Züchtungsmethode wesentlich verteuern. Alle 4 Stunden wurde 0,5 ml Testflüssigkeit entnommen und der Haemagglutiningehalt bestimmt.

Abb.4



Haemagglutinininteranstieg bei verschiedenen Prozentsätzen des synthetischen Nährmediums (T.C.M.)

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 4 dargestellt.

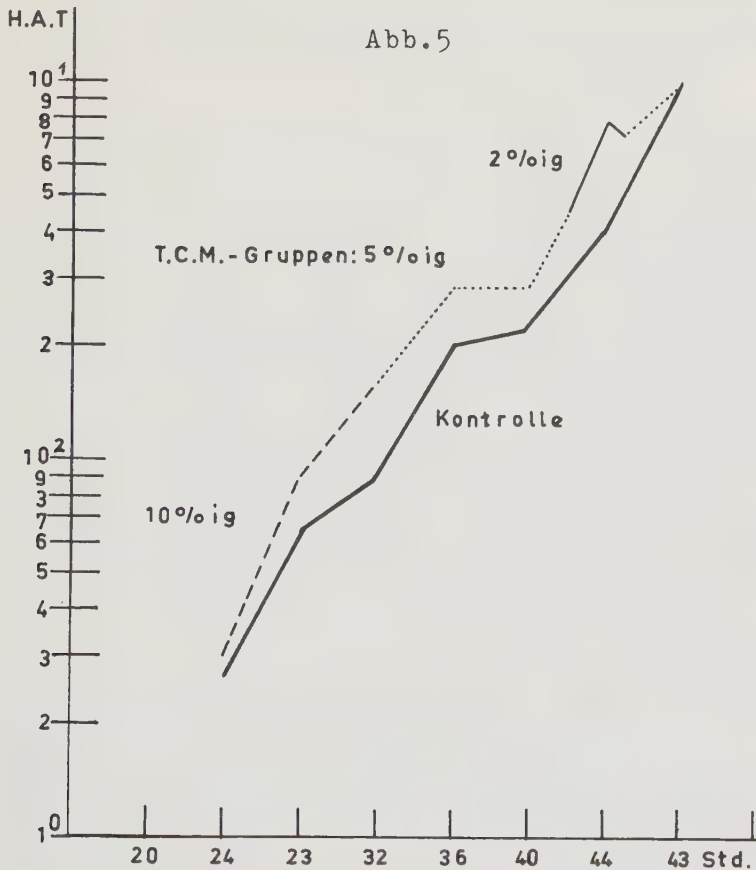
Das Haemagglutinin erreicht den zu seinem Nachweis erforderlichen Schwellenwert, wegen der sehr geringen Infektionsdosis erst nach 24 Stunden. Erst dann erfolgte in einer ersten Phase der Haemagglutinititer-Zunahme ein steiler geometrischer Anstieg. Nach 12 Stunden kommt es in allen Kurven zu einer Plateaubildung und anschließend zu einem nochmaligen steileren Anstieg. Obwohl zwischen dem 28- und 40-Stundenwert alle Einzeldurchschnittswerte der T. C. M. - Gruppen über denen der Kontrolle liegen, ist der Vermehrungsunterschied nicht sehr deutlich. Am deutlichsten sind die besseren Wachstumsbedingungen bei dem Kollektiv mit 5 %iger T.C.M.-Lösung zu sehen.

Der geringe Unterschied zwischen den T.C.M.-Gruppen und der Kontrolle im Vergleich zu den vorausgegangenen Versuchen, erklärt sich einmal in der durch die geringe Infektionsdosis stark verlängerten Latenzphase. In dieser Zeit kam es nicht nur zur Nekrose einiger infizierter, sondern auch zum Absterben zahlreicher nicht infizierter Membranzellen, die somit für die Virusvermehrung ausfielen.

Durch das synthetische Nährmedium werden zudem noch die Stoffwechselvorgänge in der Zelle begünstigt, was zur erhöhten Funktion und dadurch zum schnelleren Verschleiß der vom Kreislauf abgeschnittenen Zellen führt. Es ist somit verständlich, daß diese Zellen vorzeitig absterben und damit für die Virusmultiplikation ausfallen. Dies wird umso früher eintreten, je intensiver der Stoffwechsel und die Funktion der Zellen vorher gewesen sind.

Die intensivierte und beschleunigte Stoffwechseltätigkeit der Zellen und die damit im Zusammenhang stehenden besseren Vermehrungsbedingungen für Viren zeigt deutlich die Abb. 5, in der Ausschnitte der verschiedenen T.C.M.-Kurven von Abb. 4 dargestellt sind.

Zu Vermehrungsbeginn enthält die Nährlösung mit 10 %igem Zusatz von synthetischem Nährmedium das meiste Haemagglutinin. Doch nach 48 Stunden liegt diese Gruppe mit ihren Durchschnittswerten am niedrigsten (Siehe Abb. 4 und 5). Dann führt über die längste Strecke die Gruppe mit 5 %igem Nährmedium. Anschließend liegt kurz die Gruppe mit 2 %igem T.C.M. am höchsten, und am Schluß nach 48 Stunden enthält die Kontrollgruppe die meisten Haemagglutinine.



Darstellung von Ausschnitten der 3 Haemagglutininvermehrungskurven mit T.C.M.-Nährmedium aus Abb. 4

(Erklärung siehe Text)

Die Zellen, die mit 10%iger T.C.M.-Lösung gespült wurden, zeigten nicht nur eine durch den anfänglichen besseren Stoffwechsel hervorgerufene Steigerung der Virusvermehrung zu diesem Zeitpunkt; diese Zellen waren auch am schnellsten erschöpft, sodaß 2 Tage nach der Exembryonierung nur noch wenige Zellen für die Virusvermehrung zur Verfügung standen. Bei einer größeren Infektionsdosis wie sie im zweiten Versuch benutzt wurde, hätte in dieser Gruppe zweifellos die stärkste Vermehrung stattgefunden.

Die Menge des zugesetzten synthetischen Nährmediums steht, wie es die Abbildung sehr schön zeigt, eindeutig in Relation zur Zellfunktion und zur Virusvermehrung.

Fördernd auf die Produktion des Phagenproteins wirken Aminosäuren, am stärksten die Glutaminsäure (69). Diese Feststellung ist sicher in einem gewissen Bereich auch für andere Virusstämme gültig. Ackermann und Mitarb. (1,2) konnten auf Grund eigener Versuche berichten, daß die infizierte Chorioallantois-membran nicht in der Lage ist, in vitro die Aminosäure 1-Methionin aus ihren Vorläufern, dem Betain und dem Homocystein, zu synthetisieren. Außerdem stellen sie fest, daß das Methionin für die Synthese des Influenzavirus notwendig ist und daß diese Aminosäure zum Zeitpunkt der Infektion entweder als freie Aminosäure oder als Teil eines größeren Moleküls den Membranzellen zur Verfügung stehen muss.

Beide Feststellungen untermauern die gezeigte günstige Wirkung des synthetischen Nährmediums auf die Virusvermehrung im embryonierten Brutei, weil das Nährmedium die oben angeführten Aminosäuren in günstiger Konzentration enthält.

Eine weitere Fundamentierung unserer Versuchsergebnisse ist durch eingehende histologische Untersuchungen sicher noch möglich.

III. Das Cortison und seine Wirkung auf den Zellstoffwechsel und die Virusinfektion.

Da die Ergebnisse in Versuchsgruppe II uns schon auf die Bedeutung des Zellstoffwechsels für die Virusmultiplikation hinwiesen, versuchten wir uns über dieses Geschehen noch weitere Klarheit zu verschaffen. In unseren weiteren Versuchen überprüften wir daher die Möglichkeit einer Veränderung der Stoffwechselausgangslage auf hormonalem Wege.

Die bekannte Wirkung der Glucocorticoide und besonders des Cortisons auf den Zellstoffwechsel hat uns veranlaßt dieses Hormon zur Prüfung einiger wichtiger Fragen heranzuziehen. Folgende Fragen waren für unsere Untersuchungen ausschlaggebend:

- 1) Ist die einzelne Zelle selbst der Angriffspunkt des Cortisons, oder sind die bekannten Stoffwechselbeeinflussungen nur über die vorgeschalteten Organsysteme im intakten Organismus auslösbar?
- 2) Hat das Cortison eine Stoffwechselwirkung auf die isolierte Membranzelle der Chorioallantois, wie sie im embryonierten Brutei vorliegt?
- 3) Wie läßt sich ein verändertes Stoffwechselgeschehen möglichst genau feststellen?
- 4) Vermag Cortison auch im embryonierten Brutei die Virusmultiplikation zu beeinflussen?

Zuerst sollen in kurzer Form noch einige wichtige Erkenntnisse über den Zell- und Virusstoffwechsel und über die Cortisonwirkung angeführt werden.

Alle Virustypen haben eines gemeinsam, nämlich die Eigenschaft, sich nur in lebenden Zellen zu entwickeln. Sie müssen sich also notwendigerweise der Hilfsmittel der Zelle, ihres chemischen Stoffwechsels oder ihrer Strukturelemente oder beider für ihren Lebensprozess bedienen. Die Ursache zu diesem obligaten intrazellulären Parasitismus (7) ist, wie biochemische Untersuchungen zeigen, das inkomplette Stoffwechselsystem der Viren, was wahrscheinlich in der Hauptsache den Enzymapparat betrifft (18). Der grundlegende Energiestoffwechsel der Viren ist somit absolut vom Stoffwechselsystem der Wirtszelle abhängig (18). Die einzelne Zelle ist also der direkte Angriffspunkt auf den Wirtsorganismus.

Der Virusangriff auf die Wirtszelle und ihre Zerstörung ist immer eine Folge des Vermehrungsprozesses selbst. Auch die Zellschädigung beginnt in diesem Zusammenhang unter Ausnutzung des chemischen Stoffwechselsystems der Wirtszelle (18). Der Angriff der Viren auf den Organismus als Ganzes hängt somit direkt mit ihrem Vermehrungsprozess zusammen und mit der damit in der Zelle auftretenden Störung des Stoffwechsels.

Der Grundprozess jeder Vermehrung ist die Synthese von Eiweiß (18). Nirgends tritt das wohl klarer hervor als gerade bei den Viren, wo Formen gefunden werden, die ausschließlich aus einem Eiweiß und einer Nucleinsäure bestehen. Das Virus bedient sich also zur identischen Reduplikation der Proteinsynthese der lebenden Zelle (7).

Der Eiweißbildungsprozeß der höher organisierten Zelle läßt sich im Hinblick auf die besondere Bedeutung der Strukturelemente in 2 Gruppen einteilen:

- 1) Bildung des Geneiweißes als fundamentalem Prozeß des lebenden Gewebes. Dieser Prozeß läuft in den getragenden Strukturen, dem Chromonema oder den Chromosomen, ab.
- 2) Bildung des Cytoplasmaweißes, die durch Gene des Genoms induziert wird. Wie zellchemische Untersuchungen zeigen, produzieren spezielle Teile des Genoms Substanzen von Eiweißcharakter, welche dann zum Teil zu Kernkörpern und Nucleolen angesammelt werden. Eine weitere Entwicklung von Eiweißmassen findet, durch Gensubstanzen hervorgerufen und nur bei Anwesenheit von Ribonucleinsäure, an der Außenseite der Kernmembranen statt. Die Gegenwart einer Nucleinsäure scheint die Voraussetzung für die Eiweiß-Synthese der lebenden Zelle zu sein (18).

Die beiden Haupttypen der Nucleinsäure, die Ribonucleinsäure (RNS) und die Desoxyribonucleinsäure (DNS), haben in verschiedener Hinsicht unterschiedliche Eigenschaften. So bildet die Desoxyribonucleinsäure sehr lange stabile Molekülketten. Dieser Nucleinsäuretyp, der sich sehr für den Aufbau linearer Strukturelemente eignet, ist charakteristisch für die Genkette des Chromosomenapparats (18).

Das Prinzip, daß eine Nucleinsäurekomponente für den Ablauf der Eiweiß-Synthese notwendig ist, müßte auch auf die Viren anwendbar sein. So finden sich auch bei den einfachsten Virusarten, die nur eine einzige Eiweißgruppe enthalten, Nucleinsäuren vom Ribosetyp, während die höheren Virustypen mit mehreren Eiweißgruppen von Gencharakter, Träger für Desoxyribonucleotide, also der Chromosomennucleinsäure, sind. Durch diesen sog. Eiweißproduktionsapparat besitzen die Viren die Voraussetzung zur Vermehrung lebenden Materials (7,32).

Stoffwechsel bedeutet in erster Linie Umsetzung chemischer Substanz im Organismus mit dem Ziel, bestimmte Funktionen zu ermöglichen. Dazu gehört in erster Linie Energie. Diese ermöglicht überhaupt erst chemische Leistung und Arbeitsleistung. Bei weitem die meisten Stoffwechselvorgänge in der Zelle sind Verbrennungen, also Vorgänge, bei denen hochmolekulare Körper durch Aufnahme von Sauerstoff und Freisetzung von Energie in niedermolekulare Körper zerlegt werden. Andererseits sind die makromolekularen Synthesen wie z.B. die Eiweiß-Synthese, nur unter der Wirkung von Sauerstoff möglich (10).

So ist es verständlich, daß in Organen mit gesteigerter Stoffwechseltätigkeit auch der Sauerstoffverbrauch stark erhöht ist. Der Sauerstoffbedarf der Ganglienzellen der grauen Substanz des Gehirns ist z.B. mindestens 5 mal größer als der der markreichen weißen Substanz. Auch das tubuläre Nierengewebe hat einen doppelt so hohen Sauerstoffverbrauch wie das Leberparenchym (10).

Ein erheblicher Teil des Sauerstoffs wird dabei für oxydativen Phosphorylierungsvorgänge gebraucht (29).

Untersuchungen über den Einfluß der Viren auf die Atmung zeigten, daß der Sauerstoffverbrauch in der isolierten Chorioallantoismembran nach Infektion mit Vaccinevirus schon zu steigen beginnt, noch bevor infektionstaugliches Material nachgewiesen werden kann. Im Zusammenhang damit setzt auch eine rasche vorübergehende Aktivitätssteigerung des Eiweißbildungssystems ein. Diese äußert sich deutlich in einer starken Zunahme des Nucleolavolumens, sowie einer Vermehrung des Zelleiweißes und der Cytoplasmannucleotide. Sowohl die Steigerung der Atmung als auch die Nucleoarsubstanzvermehrung ereignen sich schon in dem frühesten Stadium der Zellinfektion, nämlich der Latenzphase (19).

Eine Vermehrung der Phagen wird auch nur dann beobachtet, wenn das Außenmedium energieliefernde Stoffe enthält. In reiner Pufferlösung oder bei Blockierung der Atmung kommt die Phagenvermehrung zum Stillstand (68).

Die Energien zur Produktion der virusspezifischen Eiweißkörper und Nucleinsäuren stammen aus den oxydativen Phosphorylierungsaktivitäten der Gewebszelle des Wirts (7,18).

Die Vorgänge des Stoffwechsels bedürfen zu ihrem Ablauf verschiedener Enzyme. Bei der für jede Zelltätigkeit notwendigen Bereitstellung von Energien aus Phosphatverbindungen durch die oxydativen Phosphorylierungsvorgänge spielt z. B. die alkalische Phosphomonoesterase eine ausschlaggebende Rolle (29).

Aber auch den Hormonen kommt beim Zellstoffwechsel eine wichtige regulatorische Aufgabe zu. Vom Verhältnis zwischen anabolen und katabolen Hormonen ist auch das Verhältnis zwischen anabolen und katabolen Reaktionsabläufen abhängig. So fördern die androgenen Steriodhormone der Keimdrüsen und der Nebentieren zusammen mit den Wachstumshormonen der Hypophyse die anabolen Vorgänge, während die Glucocorticoide entgegengesetzt katabol wirksam sind (89).

Die Grundlage dieser Stoffwechselveränderung durch die Glucocorticoide wird

zum Teil in einer Hemmung des Eiweißaufbaus und einer gesteigerten Verwendung von Aminosäuren zur Synthese von Zucker (Hypergluconeogenese) gesehen (90).

Die allgemeine proteinkatabolen Wirkungen oder mindestens die Hemmung der Eiweiß-Synthese durch die Glucocorticoide und besonders durch Cortison lassen sich mit den verschiedensten Versuchsanordnungen in allen möglichen mesenchymalen Geweben und Gewebsbestandteilen nachweisen.

Cortison wirkt ausgesprochene anti-anabolisch, d.h. es ist sowohl abbaufördernd als auch anbauhemmend. Hierdurch wird der gesamte Proteinstoffwechsel intensiviert, wobei eine negative Stickstoffbilanz zur Beobachtung kommt (30).

Cortisonwirkung auf den Stoffwechsel

Karnofsky (43) konnte durch Untersuchungen an Hühnerembryonen zeigen, daß durch Cortison das Wachstum und die Entwicklung jenseits des 8. - 10. Bebrütungstages erheblich gehemmt wird. Auch Evans (24) stellte nach Injektion von 1 mg Cortisonacetat in die Allantoishöhle eine starke Wachstumsverzögerung und -hemmung der Embryonen fest. Die Entwicklungshemmung erfolgte allgemein gesehen proportional, doch zeigten Organwägungen, daß das Lebergewicht im Vergleich zur Kontrolle besonders stark vermindert war (- 86%) und daß die Augen und Gonaden relativ größer waren. Auch die Längenentwicklung des Embryos und seiner Extremitäten war zwischen dem 8. und 10. Bebrütungstage am stärksten gehemmt.

Pickman und Mitarb. (62) konnten jedoch zeigen, daß auch schon vor dem 8. Bebrütungstage eine Hemmung des Embryonenwachstums durch Cortison eintritt. Sie injizierten das Cortison schon am 1. Bebrütungstage und einer zweiten Gruppe am 2. und 3. Tag und konnten am 4. Tag in der ersten Gruppe und am 7. und 10. Tag in der zweiten Gruppe bereits eine Wachstumsverminderung feststellen. Im frühesten Embryonalstadium lag der Schwerpunkt der Wachstumsverzögerung auf einer Hemmung des Längenwachstums, während in der späteren Periode das Gewicht der Embryonen durch Cortison stärker vermindert war.

Zwei typische Wirkungen des Cortisons sind in den Versuchsergebnissen von Sobel (81) besonders auffallend: Einmal eine allgemeine Hemmung der Embryonalentwicklung, sichtbar an der Verzögerung des Längenwachstums und einer deutlichen Gewichtsverminderung und zweitens eine Zerstörung der physiologischen und metabolischen Prozesse, deutlich erkennbar an einer Erweiterung des Herzens, einer fettigen Degeneration der Leber und an Veränderungen der Elektrolyt- und Zuckerausscheidung. Außerdem wurde eine erhebliche Steigerung der Mortalität (40 %) bei den mit Cortison beimpften Tieren festgestellt.

Die allgemeine Hemmung mesenchymaler Strukturen durch Cortison kommt zum Ausdruck in einer Schmälerung der Wachstumszone der langen Röhrenknochen (4, 28) und auch in einer Hemmung des enchondralen Wachstums durch Cortison (82).

Hierzu gehört auch die beobachtete Hemmung der Bildung von Fremdkörpergranulomen durch ACTH und Glucocorticoide wie sie von Selye (72) beobachtet wurde. Mit der von ihm entwickelten Methode der Granulomtasche lassen sich die Entzündungserscheinungen in verschiedenen Stadien und insbesondere die Bildung von Granulationsgewebe gut erfassen.

Sowohl histologisch als auch durch Gewichtsbestimmungen des entstehenden Granuloms lassen sich qualitative und quantitative Vergleiche ziehen. Auch hier wirkt Cortison stark hemmend. Die quantitative Methode der Gewichtsbestimmung ergibt eine annähernd dosisproportionale Wirkung des Cortisons (73).

Durch das Setzen eines Wundeffekts am Kaninchenohr kommt es auch zu einer Granulombildung. Der Unterschied in der Masse des gebildeten Granulationsgewebes nach Cortisoneinwirkung ist in diesen Versuchen besonders eindrucksvoll (64).

Cortisoneinwirkung auf die Atmung.

Die kohlehydratattraktiven Corticosteroide haben eine sicher nachgewiesene extrathyroidal bedingte, den Grundumsatz steigernde Wirkung. Anfänglich kann der Grundumsatz nach Cortison und Hydrocortison auf mehr als + 40 - 50 % ansteigen. Diese Grundumsatzsteigerung kann ohne weiteres als Ausdruck einer gesteigerten spezifisch-dynamischen Wirkung durch vermehrte Eiweißverbrennung gedeutet werden (88).

Als Grundwirkung der Glucocorticoide auf den Stoffwechsel wird man also festlegen können: Eine Grundumsatzsteigerung auf peripher-celulärer Basis, Steigerung der spezifisch-dynamischen Wirkung als Folge erhöhten Eiweißabbaus und damit Reduktion des RQ. bei gleichzeitiger Hemmung der Kohlehydratverbrennung (88).

Ein gutes Beispiel für diese Wirkung ist der Morbus Cushing, der ausgelöst wird durch ein Adenom oder Karzinom der Nebennierenrinde. Das Cushing-Syndrom entsteht aber auch bei Behandlung mit Cortison und ACTH beim Lupus erythematosus acutus und bei zahlreichen anderen Erkrankungen, bei denen größere Mengen Cortison verabreicht werden.

Beim Morbus Cushing findet man, obwohl die Schilddrüse nicht deutlich vergrößert ist, eine Steigerung des Grundumsatzes; d.h. die Verbrennungsvorgänge laufen leicht beschleunigt ab und die Verbrennungsintensität ist erhöht. Der RQ liegt relativ niedrig, was besagt, daß vor allem Eiweisse und etwas Fette verbrannt werden; die Kohlehydratverbrennung ist gehemmt (20).

Nimmt der Hypercorticoidismus zu, so wird die Stickstoffbilanz negativ (20).

Brummel und Mitarb. (9) konnten zeigen, daß Desoxycorticosteron und Testosteron den Sauerstoffverbrauch von Nebennierenrindengewebe im Warburgapparat signifikant steigert. Sie geben in der gleichen Arbeit an, daß Cortison, Progesteron und 3 weitere NNR-Hormone keine Einwirkung auf den Sauerstoffverbrauch des Nebennierenrindengewebes haben. Obwohl die Wirkungslosigkeit oder die negative Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch von 4 Hormonen dargestellt wird, ist eine Wirkung des Cortisons gleich welcher Richtung in den einzelnen Versuchsergebnissen überhaupt nicht angeführt.

Cortisoneinwirkung auf die Virussyntese.

Es ist zu erwarten, daß ein Hormon mit einer solch starken Beeinflussung der Stoffwechselleistungen der Zelle auch auf die zellgebundene Virusmultiplikation eine Einwirkung hat.

Bei der Stimulierung des Eiweiß-Stoffwechsels durch Cortison und zwar sowohl im Sinne des Aufbaus wie des Abbaus (22,23) muß auch zwangsläufig der Nucleinsäurestoffwechsel aktiviert werden. Es ist dabei nicht erheblich, wenn der Abbau zeitweise den Aufbau mengenmäßig übersteigt (wie dies bei Cortison der Fall ist). Entscheidend für die Virusinfektion ist die Intaktheit und Stimulierung der Synthese. Die Erfahrung mit Bakteriophagen (19) läßt die Annahme zu, daß auch in der tierischen Zelle die beim Abbau von Proteinen und Nucleinsäuren freiwerdenden Bruchstücke der gleichzeitigen Synthese von Virusnucleinsäuren und -proteinen dienstbar gemacht werden, wogegen die Großmoleküle einen schlechten "supply" darstellen (63).

In ihrem Zellstoffwechsel stark geschädigte Zellen müßten also nur eine geringe oder überhaupt keine Fähigkeit zur Virusmultiplikation besitzen. Diese Zellen hätten dann eine partielle oder totale Resistenz gegen eine Virusinfektion. In der Tat findet man bei einer Thiaminmangelernährung von Mäusen eine verminderte Anfälligkeit gegen Poliovirus-Infektionen (65).

In vielen Fällen wird die Stimulierung der Nucleinsäure- und Proteinsynthese in der Zelle durch die Virusinfektion allein ausgelöst (18). Im Falle der mehr oder minder ruhenden Infektion bedarf es aber über das Eindringen des Virus eines zusätzlichen Reizes, um die Virusmultiplikation auf ein Ausmaß zu bringen, das der Wirtszelle schädlich wird.

Einige dieser zusätzlichen Reize sind z.B. körperliche Anstrengungen, Traumen, Kälte, Hunger, Immunisierung, Schwangerschaft u.s.w., also Stress-Situationen, wovon wir wissen, daß sie zur Cortisonausschüttung führen (72).

Zahlreiche Autoren konnten in einer Reihe experimenteller Untersuchungen, einmal am Tier, zumeist aber am Brutel bzw. an der isolierten Allantoismembran die Beeinflussbarkeit des Virusinfektes durch Cortison zeigen.

So berichtet Schwarzmann (70) daß Cortison allein oder gemeinsam mit ACTH in hohem Maße einen schweren Verlauf der Poliomyelitis beim Goldhamster begünstigt. Die intraperitoneale Infektion, die sonst überhaupt ohne klinische Folge bleibt, führt unter Cortison meist zu einem tödlichen Ausgang. Die letale Virusdosis ist umgekehrt proportional zur Cortisongabe. Außerdem stellten sie eine Erhöhung der Viruskonzentration fest (3).

Auch Kilbourne und Daves (44) fanden, daß unter Cortison ein nicht mäuseadaptierter Influenza-A-Stamm erheblich früher mäusepathogen wurde als bei Tieren, die kein Cortison erhalten hatten. Bei einer sehr hohen Cortisonosis (3 - 5 mg) zeigten sich schon in der 3. Passage Lungenödemen, während diese Veränderungen ohne Cortison erst in der 10. Passage auftraten. Aber nicht nur in der Lunge, sondern auch in der Leber wurde die Vermehrung von Influenzaviren gefördert. Die Leber ist das Organ, in dem die Stimulierung des Zellstoffwechsels durch Cortison zu einer deutlichen anabolen Wirkung mit kräftiger Proteinsynthese führt (76). Auch die Antikörperbildung wird bei den mit Influenzaviren infizierten Mäusen unterdrückt (45).

Wasielewski und Mitarb (84) berichten über Versuche mit Mäusen, bei denen die Cortisonapplikation, eine Stunde vor der Infektion mit Influenzavirus PR8 und EMC-Virus, zu einer deutlichen Veränderung der mittleren Absterbegeschwindigkeiten führte. Die Corticoidwirkung zeigte bei beiden untersuchten Virusstämmen eine deutliche Abhängigkeit von der Infektionsdosis; bei hoher Virusdosis war die Absterbegeschwindigkeit nicht sicher verschoben, während bei niedriger Virusdosierung eine signifikante Erhöhung der mittleren Absterbegeschwindigkeit der unter Cortisonwirkung stehenden Tiere festzustellen war. Überraschend war jedoch die Feststellung, daß der Virusgehalt der Gehirne dieser unter Cortison stehenden Tiere statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Die Befunde werden dahingehend gedeutet, daß die erhöhten Absterbegeschwindigkeiten einmal eine Folge der durch die Cortisonzufuhr bedingten eingeschränkten Abwehr aufzufassen sind. Beobachtungen am infizierten Brutei (86) wiesen aber auch darauf hin, daß die durch die niedrige Infektionsdosis erheblich verzögerte Sterblichkeitsreaktion eine weiter unter angeführte zweite Phase des Cortisoneffektes, nämlich die überschießende Virusmultiplikation, ermöglicht, wodurch diese Tiere dann auch ad exitum kommen.

Über den Einfluß von Cortison auf die Multiplikation von Influenzaviren im bebrüteten Hühnerei liegen von Kilbourne und Mitarb. mehrere Arbeiten vor.

In ihrer ersten Veröffentlichung auf diesem Gebiet (46) konnten sie feststellen, daß eine einmalige Injektion von Cortison in den Dottersack 30 Minuten bis 48 Stunden vor der Infektion mit Viren (B-Lee, PR8, Mumps) die Virusausbeute signifikant erhöhte. Sie fanden auch heraus, daß eine deutliche Abhängigkeit der Virusausbeute vom Zeitpunkt der Cortisongabe besteht. Eine Cortisoninjektion vor der Infektion bewirkt eine verkürzte Lebenszeit der Embryonen. Cortisonzufuhr bis zu 20 Stunden nach der Infektion ließ bei unveränderter Absterbezeit eine starke Virusvermehrung erkennen, während eine Zugabe von Cortison 24 und mehr Stunden nach der Infektion keine Erhöhung der Virusproduktion bei verlängerter Absterbezeit verursacht (47).

Über den zeitlichen Ablauf der Virusmultiplikation berichtet Kilbourne (48), daß bei cortisonbehandelten Bruteiern eine initiale Hemmung der Virusmultiplikation eintritt, der aber dann eine starke Erhöhung der Multiplikation im Vergleich zur Kontrolle nachfolgt. In einer späteren Arbeit (49) wurde der gleiche diphasische Effekt des Cortisons im intakten Brutei beobachtet. Eine Erklärung für dieses Phänomen glaubt der Autor einmal in einer Wirkung auf die Zellpermeabilität oder in einer anfänglichen Hemmung der Virussynthese und einer darauffolgenden Hemmung der Autointerferenz zu sehen (49).

Kilbourne und Tateno (50) berichteten auch über die Wirkung des Cortisons auf den Verlauf der Virusinfektion bei Chorioallantoismembranstückchen in vitro. Gleichzeitig mit der Infektion mit Influenzaviren (B-Lee) wurde eine einmalige Cortisongabe von 14 Gamma/ml verabreicht. In den ersten Nachbebrütungsstunden war keine Differenz im Virusgehalt sichtbar, doch gegen Ende der Bebrütungszeit enthielten die Cortisongruppen erheblich mehr Viren als die Kontrollen.

Bemerkenswert ist es auch, daß sogar thermisch inaktivierte Influenzaviren im Hühnerembryo durch Cortisonzufuhr aktiviert werden können und eine hohe Ausbeute an infektiösen Viren zustande kommt (51).

Cortisoneinwirkung auf die Zellmembran

Die Wirkung der Rindenhormone, die zu einer Natrium- und Kaliumverschiebung in der Niere und auch in anderen Drüsen führt, geht, wie neuere Untersuchungen zeigen (90), allgemein über den Bereich der Drüsenfunktionen hinaus und betrifft auch Kalium- und Natriumverschiebungen durch die Zellmembran mindestens einer größeren Anzahl verschiedener Zellen, die nicht Drüsencharakter haben.

Bilanzversuche von Flanagan (27) und Untersuchungen von Grollmann (36) lassen sich dahingehend deuten, daß durch eine Rindeninsuffizienz die Verteilung von Natrium und Kalium in der Zelle (innen vorwiegend Kalium, außen vorwiegend Natrium), die durch das Nebeneinander von aktiven und passiven Verschiebungen aufrecht erhalten wird, im Sinne eines "Lecks" verändert wird, weil die "Pumpen" insuffizient werden, d.h. der Kaliumgehalt der Zelle nimmt ab und der Natriumgehalt nimmt zu.

Auch eine hormonale Beeinflussung des Aminosäuretransportes durch die Zellmembran ist nachgewiesen worden (42). Für die Resorption von Aminosäuren aus dem Darm und die Rückresorption aus den Nierentubuli, sowie für die katabolen Vorgänge des Aminosäure-Stoffwechsels und die Akkumulation von Aminosäuren in der Leber, die beide durch Nebennierenrinden-Hormone hervorgerufen werden, ist ein "konzentrativer Transport" von Aminosäuren durch die Zellmembran erforderlich.

Hydrocortison hat eine starke Einwirkung auf den Transport von Aminosäuren durch die Zellmembran. Zwei Stunden nach der Injektion von Hydrocortison kam es zu einer deutlichen Steigerung der Amino-Isobuttersäure-Konzentration in der Leber und im Blutplasma.

Auch die Tatsache, daß der Angriffspunkt der Influenzaviren bei der Haemagglutination ein Mucopolysaccharid der Erythrocytenoberfläche ist, spricht für eine Einwirkung des Cortisons auf die Zellmembran. Durch Zugabe von Mucopolysacchariden zur Erythrocytenaufschwemmung kann man die Haemagglutination durch Influenzaviren hemmen (55).

Mancini (58) konnte bei Versuchen über die Wirkung der Glucocorticoide auf die Bildung ungeformter und geformter Intercellularsubstanz histochemisch nachweisen, daß durch Cortison die Bildung saurer Mucopolysaccharide im Inneren der Zelle und ihr Auftreten in der Umgebung in der Gewebekultur gehemmt wird.

Ein weiterer Hinweis für eine Cortisonwirkung auf die Zellmembran ist die Feststellung, daß sich eine Infektion mit manchen schwer übertragbaren Viruskrankheiten erzwingen läßt, wenn gleichzeitig Cortison verabfolgt wird (68).

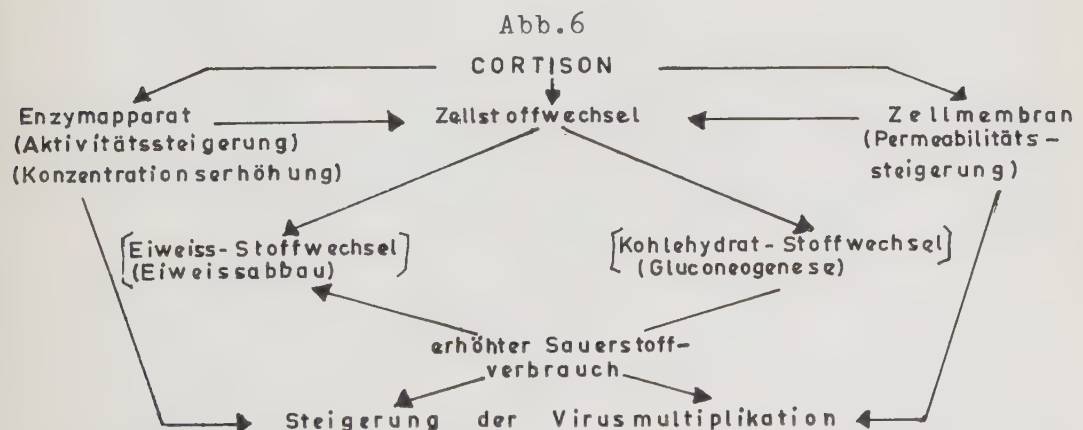
Auch die Begünstigung einer Virämie durch Cortison in den Versuchen von Schwarzmann (70) läßt sich in diesem Sinne deuten.

Cortisoneinwirkung auf den Enzymapparat

Es liegt auf der Hand, daß Zellen, die eine lebhaft Virussyntese zeigen, eine in hohem Masse funktionstüchtige und komplette Enzymausrüstung besitzen müssen.

Daß Cortison auch einen Einfluß auf die Enzyme hat, zeigt ein Versuch von Frey (29), der darin zeigen konnte, daß im Tierversuch nach Adrenalektomie eine signifikante Reduzierung der alkalischen Phosphatase stattfand. Auch die Aktivität der ATP-ase ist bedeutend verkleinert. Ebenso ist die Konzentration von ATP und Phosphokreatin stark vermindert. Im Zustand der ausgesprochenen Nebenniereninsuffizienz kommt es also zu einer starken Abnahme der Konzentrationen von energiereichen Phosphatverbindungen und der Aktivität der Enzyme, die die Transphosphorylierungen im Auf- und Abbau besorgen. Bei Substitution mit Cortison und Desoxycortiscosteronacetat in hohen Dosen erhöht sich die Aktivität der untersuchten Fermente während die Konzentration von ATP offensichtlich infolge eines erhöhten "turnover" unterhalb normaler Verhältnisse bleibt.

Die oben angeführten Wirkungen des Cortisons und ihre Bedeutung für die Virusvermehrung sollen in einem Schema noch einmal in übersichtlicher Form zusammengefasst werden. Dieses Schema kann jedoch nicht alle Einzelheiten der komplexen Cortisonwirkungen berücksichtigen.



Schematische Darstellung der Cortisoneinwirkung auf die Virussyntese

Eigene Untersuchungen

Wirkung des Cortisons auf das Wachstum der Hühner- embryonen

Im Zusammenhang mit den von Karnofsky (43) und Evans (24) gemachten Befunden am bebrüteten Hühnerei nach Cortisoneinwirkung wurden auch in unserem Labor ähnliche Versuche am Brutstadium durchgeführt (86), um die Wirkung des Cortisons auf das Wachstum der Hühnerembryonen zu überprüfen. Da die damaligen Versuche aus technischen Gründen nicht zu Ende geführt werden konnten und lediglich festgestellt wurde, daß die cortisonbehandelten Tiere 5 - 35 % leichter waren als die Kontrollen, haben wir uns entschlossen, diese Cortisoneinwirkung nochmals genau zu studieren. In der Hauptsache ging es uns dabei um die Klärung der Frage: Wie lange hält die nachgewiesene wachstumshemmende Wirkung des Cortisons an und zu welchem Zeitpunkt liegt das Maximum dieser Wirkung?

Versuchsanordnung

50 Hühnereier vom weißen Leghorn wurden vor dem Einlegen in den Brutschrank einzeln gewogen und nummeriert. Nach zehntägiger Begrütungszeit wurden 25 befruchtete Eier nach vorausgegangener Durchleuchtung und Markierung in der bereits angegebenen Weise mit je 0,2 ml einer 10 %igen Cortisonlösung (Incortin "Merck", 25 mg/ml), also 0,5 mg/Ei, in die Allantoishöhle beimpft und anschließend weiter bebrütet. Nach 2 Tagen wurden dann je 3 Eier der Cortison- und Kontrollgruppe exembryoniert und jeder Embryo säuberlich von den ihn umgebenden Häuten befreit. Um alle Reste von Dotter und Blut zu entfernen, wurden sie mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nachdem die Embryonen auf Filterpapier abgetropft waren, wurden sie nass gewogen. Das festgestellte Embryonengewicht wurde auf ein Ei - gewicht von 50 g umgerechnet. Aus den Durchschnittsgewichten beider Gruppen wurde dann die Gewichts Differenz bestimmt. Alle 2 Tage wurde bei 2 weiteren Dreiergruppen das Durchschnittsembryonengewicht festgestellt und tabellarisch und graphisch aufgezeichnet (siehe Tabelle 2 und Abb. 7).

Ergebnisse

Schon 2 Tage nach der Cortisoninjektion war eine Hemmung des Wachstums der Hühnerembryonen zu konstatieren. Das Durchschnittsgewicht der Cortisongruppe lag zu diesem Zeitpunkt schon 14% unter dem der Kontrolle. Die Gewichts Differenz vergrößerte sich in den 2 darauffolgenden Tagen nicht, doch von dem 16. Bebrütungstage wurde die Cortisonwirkung wesentlich deutlicher. Nun konnten man auch schon mit dem Auge die unterschiedliche Größe der Embryonen erkennen, besonders das Extremitätenwachstum und die Federentwicklung war im Vergleich zu den Kontrolltieren stark zurückgeblieben. Bei den nachfolgenden Gruppenuntersuchungen wurden diese Unterschiede noch eindrucksvoller. Zwischen dem 7. und 10. Tage nach der Cortisonzufuhr war die Wachstumsverzögerung am deutlichsten sichtbar; einmal weil in diesem Zeitraum die Wachstumsschwachrate bei den unbeeinflussten Embryonen besonders groß war, zum anderen, weil die Wachstumskurve der mit Cortison behandelten Embryonen nicht mehr proportional Schritt hielt, sondern sogar etwas flacher anstieg. Am 10. Tage nach der Cortisongabe erreichte der Gewichtsunterschied mit 49 % sein Maximum. Bei den unbehandelten Bruteiern kam es zum normalen Zeitpunkt nach 21 Tagen zum Schlüpfen der Küken, während es keinem der Cortisontiere gelang, die Kalkschale zu sprengen. 3 Tage nach der normalen Schlupfzeit waren alle Cortisontiere im Ei abgestorben, obwohl wahrscheinlich infolge einer nun abnehmenden Cortisonwirkung, die Gewichtskurve wieder etwas steiler angestiegen war.

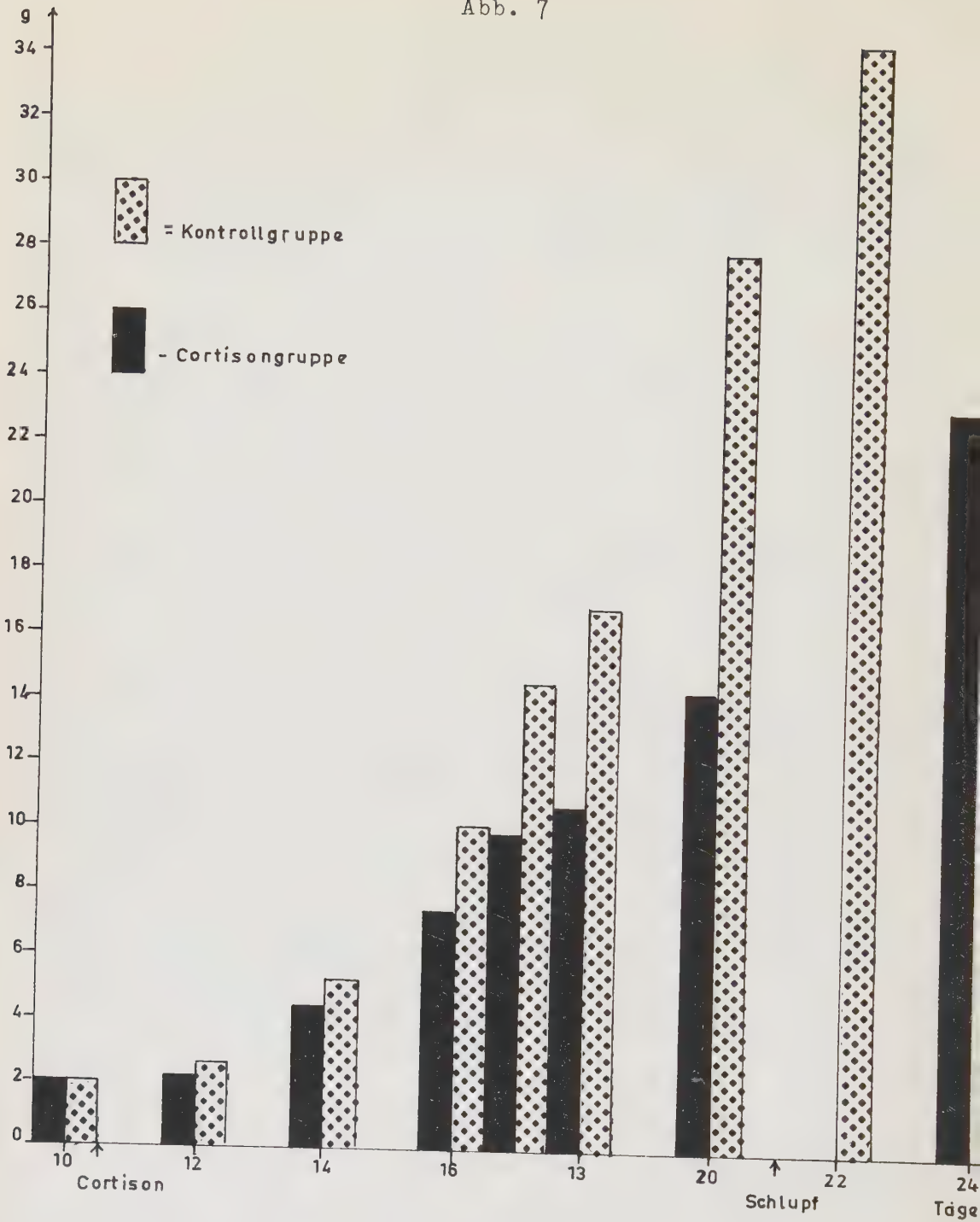
Tabelle 2

C O R T I S O N

ø

Tag. der Bebr.	Ei- Nr.	Ei- Gew.	tatsächl. Embryonen- Gewicht	Embryonen- Gew. auf 50g Ei- gew.umger.	Ei- Nr.	Ei- Gew.	tatsächl. Embryonen- Gewicht	Embryonen- Gew. auf 50g Ei- gew.umger.	Diff. in % u. g
12. Tag	1	42 g	1,925 g	2,295 g	26	48 g	2,440 g	2,540 g	
	2	48 g	1,935 g	2,019 g	27	46 g	2,040 g	2,220 g	0,362 g
	3	44 g	2,025 g	2,281 g	28	49 g	2,860 g	2,920 g	=
				6,595 g				7,680 g	14 %
			6,95 : 3 = <u>2,198 g</u>				7,680 : 3 = <u>2,560 g</u>		
14. Tag	4	46 g	3,825 g	4,160 g	29	45 g	5,150 g	5,720 g	
	5	45 g	4,220 g	4,805 g	30	48 g	5,335 g	5,550 g	0,694 g
	6	44 g	+	./.	31	46 g	3,920 g	4,260 g	=
				8,965 g				15,530 g	13,4 %
			8,965 : 2 = <u>4,483 g</u>				15,530 : 3 = <u>5,176 g</u>		
16. Tag	8	46 g	5,960 g	6,480 g	32	48 g	9,815 g	10,220 g	
	10	47 g	7,790 g	8,280 g	33	49 g	9,410 g	9,610 g	2,800 g
	11	46 g	6,815 g	7,420 g	34	45 g	9,055 g	10,090 g	=
				22,180 g				29,920 g	28 %
			22,180 : 3 = <u>7,393 g</u>				29,920 : 3 = <u>9,973 g</u>		
17. Tag	12	46 g	8,370 g	9,100 g	35	47 g	12,670 g	13,490 g	
	13	48 g	9,220 g	9,610 g	36	43 g	12,958 g	15,080 g	4,674 g
	14	46 g	9,990 g	10,790 g	37	45 g	13,435 g	14,940 g	=
				29,500 g				43,510 g	32 %
			29,500 : 3 = <u>9,833 g</u>				43,510 : 3 = <u>14,503 g</u>		
18. Tag	15	48 g	9,870 g	10,290 g	38	47 g	15,465 g	16,440 g	
	16	49 g	+		39	45 g	15,525 g	17,290 g	6,066 g
	17	47 g	10,330 g	11,010 g	40	45 g	14,790 g	16,420 g	=
				21,300 g				50,150 g	36,2 %
			21,300 : 2 = <u>10,650 g</u>				50,150 : 3 = <u>16,716 g</u>		
20. Tag	18)				41)				
	19)	46 g	12,890 g	<u>14,160 g</u>	42)		25,730 g	<u>27,790 g</u>	13,63 g
	20)				43)				=
									49 %
24. Tag	21)				44)				
	-)	46 g	21,890 g	<u>23,800 g</u>	-)		32,200 g	<u>23,210 g</u>	
	22)				50)				
22. Tag	25)								

Abb. 7



Darstellung der Cortisonwirkung auf das Wachstum von Hühnerembryonen (0,5 mg/Ei)

Jede Säule ist das Durchschnittsgewicht von 3 Embryonen auf 50g Eigewicht umgerechnet (siehe Tab. 2)

Einfluß des Cortisons auf die Zellatmung

In diese am Embryo so deutlich sichtbare Stoffwechselbeeinflussung durch Cortison im Sinne eines Eiweißkatabolismus, müßten auch in gleichem Maße die Häute des Embryos eingezogen sein. Da den Chorioallantoismembranen eine besondere Bedeutung bei der Virusmultiplikation zukommt, haben wir nach einer Möglichkeit gesucht, auch hier das veränderte Stoffwechselgeschehen festzustellen. Die quantitativen Unterschiede sind so gering, daß sie durch eine einfache Gewichtsbestimmung kaum erfasst werden können. Da Cortison den Stoffwechsel im Sinne einer gesteigerten Eiweißverbrennung intensiviert (88), haben wir versucht durch Messung des Sauerstoffverbrauchs der Membranen im Warburgapparat einen Aufschluß über die Cortisonwirkung auf die Membranzellen zu bekommen.

Material und Methoden

Zur Membrangewinnung wurden 14 Tage lang bebrütete Hühnereier verwandt. Die Hälfte der zur Membrangewinnung vorgesehenen Eier waren 24 Stunden vor der Exembryonierung mit 0,2 ml einer 1/10 verdünnten Cortisonlösung in die Allantoishöhle beimpft worden. Als Cortisonpräparat wurde Incortin "Merck" benutzt.

Da man für die Versuche im Warburg-Kölbchen nur sehr kleine Membranmengen verwenden kann und das Abwiegen der Membranstückchen sehr umständlich, zeitraubend und auch ungenau ist, haben wir eine Methode entwickelt, die relativ einfach und schnell durchzuführen ist und uns auch genauer als das Abwiegen der Membranstückchen erscheint.

Die Bruteier wurden auf die übliche Weise exembryoniert. Die Schalenhaut und die Chorioallantoismembran wurde im Ei belassen. Anschließend wurde auf die gesamte Kalkschale mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und dann das Ei vom eröffneten stumpfen Pol her in Richtung der Längsachse in 2 Hälften geschnitten. Mit einer sterilen Korkstanze wurden von der Innenseite her aus jeder Eihälfte mehrere runde Scheiben von genau 2 cm Durchmesser ausgestanzt.

Von diesen gleichgroßen Scheiben wurde dann die Membran unter sterilen Kautelen mit einer Pinzette abgezogen. Um verbliebene Reste von Eiweiß, Dotter und Blut zu entfernen, wurden die Membranscheiben in steriler Kochsalzlösung mehrmals gespült. Je 2 Membranscheiben wurden dann mit der Schere zerkleinert und zusammen mit 2 ml Hankslösung in ein Warburgkölbchen gegeben. Die Hankslösung von 4 Kölbchen war vorher mit frischer, Influenzaviren (B-Lee) enthaltender Allantoisflüssigkeit im Verhältnis 1:100 infiziert worden, sodaß die Hankslösung noch einen geringen Infektionstiter aufwies. Es wurde mit 4 Testgruppen von je 2 Kölbchen und einem Kontrollkölbchen gearbeitet. Alle Kölbchen wurden über 8 Stunden bei konstant 37°C im Warburgapparat gehalten. Der Sauerstoffverbrauch von 2 Kölbchen wurde addiert und der errechnete Durchschnittswert in eine Kurve eingetragen. Die untersuchten Gruppen sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3

Inhalt der 4 Testgruppen im Warburgsapparat

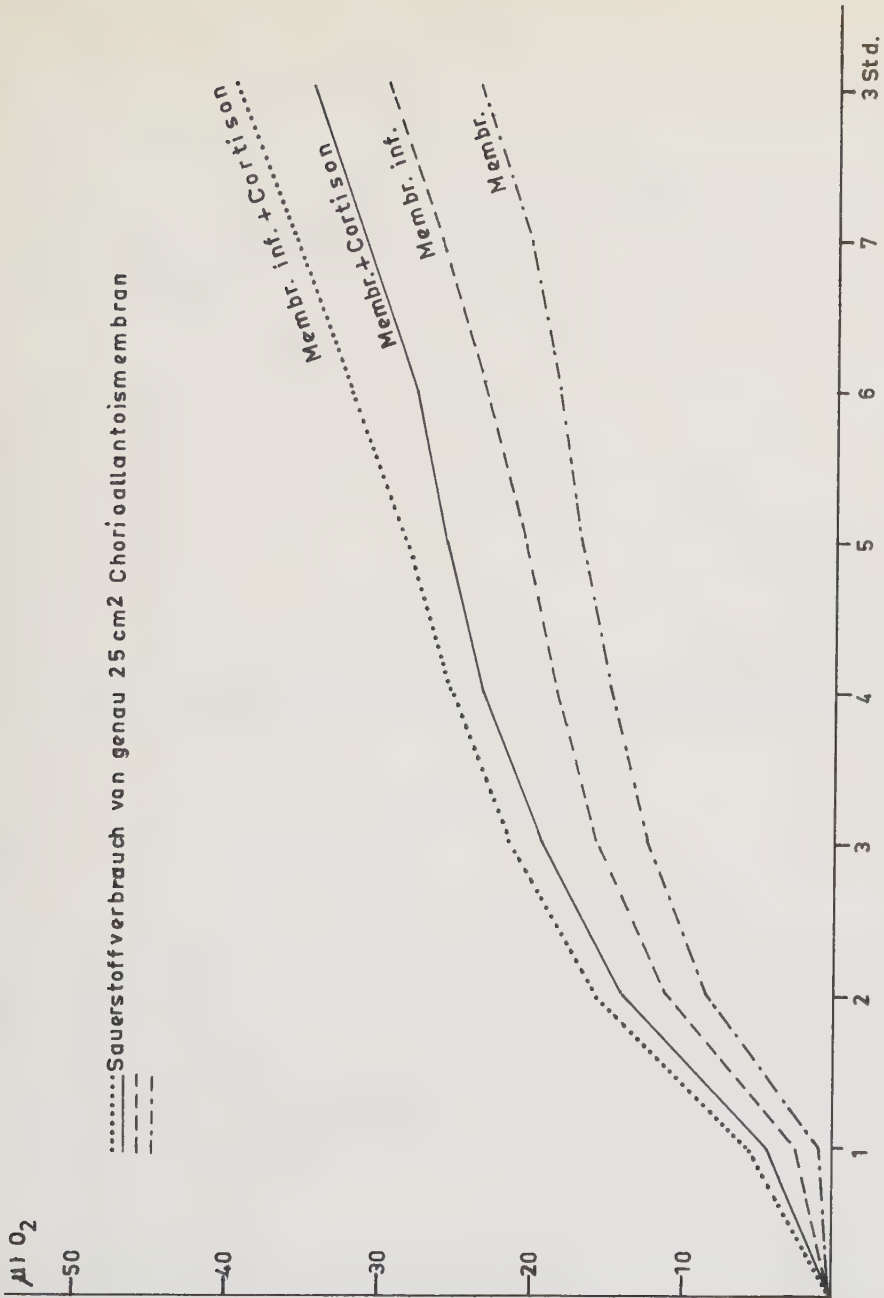
Nr.d.Kölbchens	Hankslösg. in ml	Membran- stückchen	Cortisondosis mg/kg	Virus 0,02 ml
1	2	Ø	Ø	Ø
2	2	12,5 cm ²	Ø	Ø
3	2	12,5 cm ²	Ø	Ø
4	2	12,5 cm ²	125	Ø
5	2	12,5 cm ²	125	Ø
6	2	12,5 cm ²	Ø	10 ⁻²
7	2	12,5 cm ²	Ø	10 ⁻²
8	2	12,5 cm ²	125	10 ⁻²
9	2	12,5 cm ²	125	10 ⁻²

Ergebnisse:

Der in den Kurven von Abb. 8 eingetragene Sauerstoffverbrauch der einzelnen Gruppen bestätigt einmal den von Caspersen und Thorson (18) erhobenen Befund, daß nämlich schon durch die Virusinfektion allein eine Steigerung der Atmung in Verbindung mit einer Aktivitätssteigerung des Eiweißbildungssystems hervorgerufen wird. Über den gesamten Zeitraum von 8 Stunden liegt der Sauerstoffverbrauch der infizierten Membranstückchen in den Einzeldurchschnittswerten zwischen 20 und 30 % höher als der Sauerstoffverbrauch der Membranstückchen in reiner Hankslösung. Daß aber Cortison in den Stoffwechsel der Membranzellen noch erheblich stärker eingreift als die Viruspartikel, zeigte sich schon gleich nach dem Schließen der Manometer in einem stärkeren Sauerstoffverzehr der Cortisonmembranen. Der Durchschnittswert des Sauerstoffverbrauchs lag nach 8 Stunden um 47 % höher als der der Kontrollgruppe. Die Differenz zwischen den Durchschnittswerten beider Hauptgruppen (mit Cortison und ohne Cortison) nimmt parallel zur Länge der Zeit zu; z.B. beträgt die Differenz zwischen Kontrolle und den Membranen mit Cortison nach einer Stunde 3,3 μ l O₂, nach 8 Stunden aber 11,1 l O₂. Virusinfektion und Cortison zusammen bewirkten aber die stärkste Atmungssteigerung in den Membranzellen (69 % nach 8 Stunden). Diese Wirkungssummutation ist wohl auch die Ursache für die stets gesteigerte Virusmultiplikation der Influenzaviren nach Cortisoneinwirkung auf die Chorioallantoismembran. Die annähernd gleiche Größe der Membranstückchen und damit der ungefähr gleichen Zellzahl in den einzelnen Warburg-Kölbchen, zeigte sich an dem fast gleichen Manometerstand der einzelnen Gruppen.

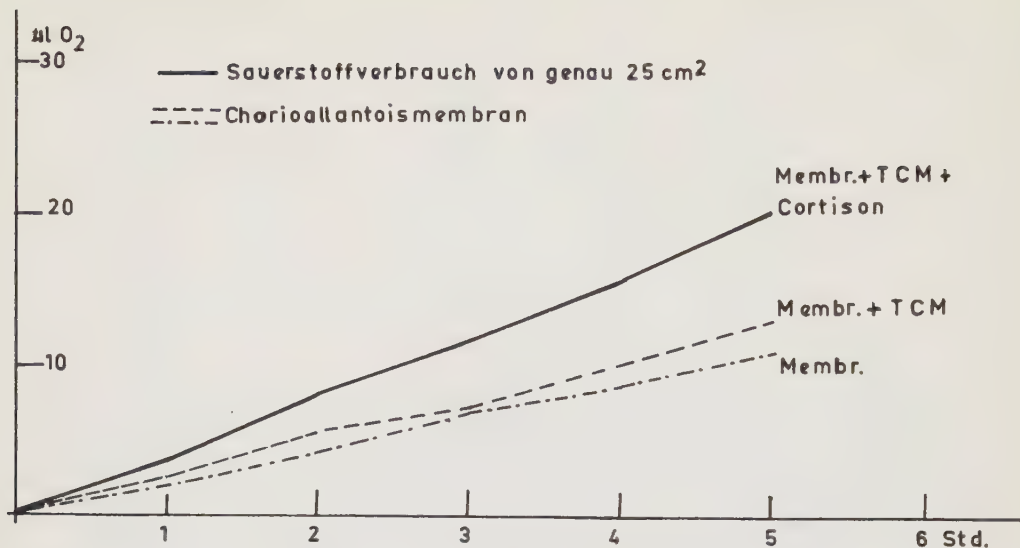
In einem weiteren Versuch im Warburgsapparat der mit der gleichen Versuchsanordnung und Methode durchgeführt wurde, testeten wir die Wirkung des T.C.M.-Nährmediums auf den Sauerstoffverbrauch der Chorioallantoismembran. Wie Abb. 9 zeigt, bewirkt das synthetische Nährmedium eine leichte Steigerung des Sauerstoffverbrauchs; der Stoffwechsel wird also durch das Medium aktiviert, was eine Bestätigung der schon angeführten Versuchsergebnisse auf Seite 16 - 18 darstellt. Die Ergebnisse der zweiten Testgruppe in diesem Versuch zeigten, daß T.C.M.-Lösung und Cortison zusammen eine signifikante Steigerung der Zellatmung hervorrufen.

Abb. 8 4



Sauerstoffverbrauch von gleichgrossen Chorioallantoismembranstückchen nach Infektion und Cortisoneinwirkung

Abb.9



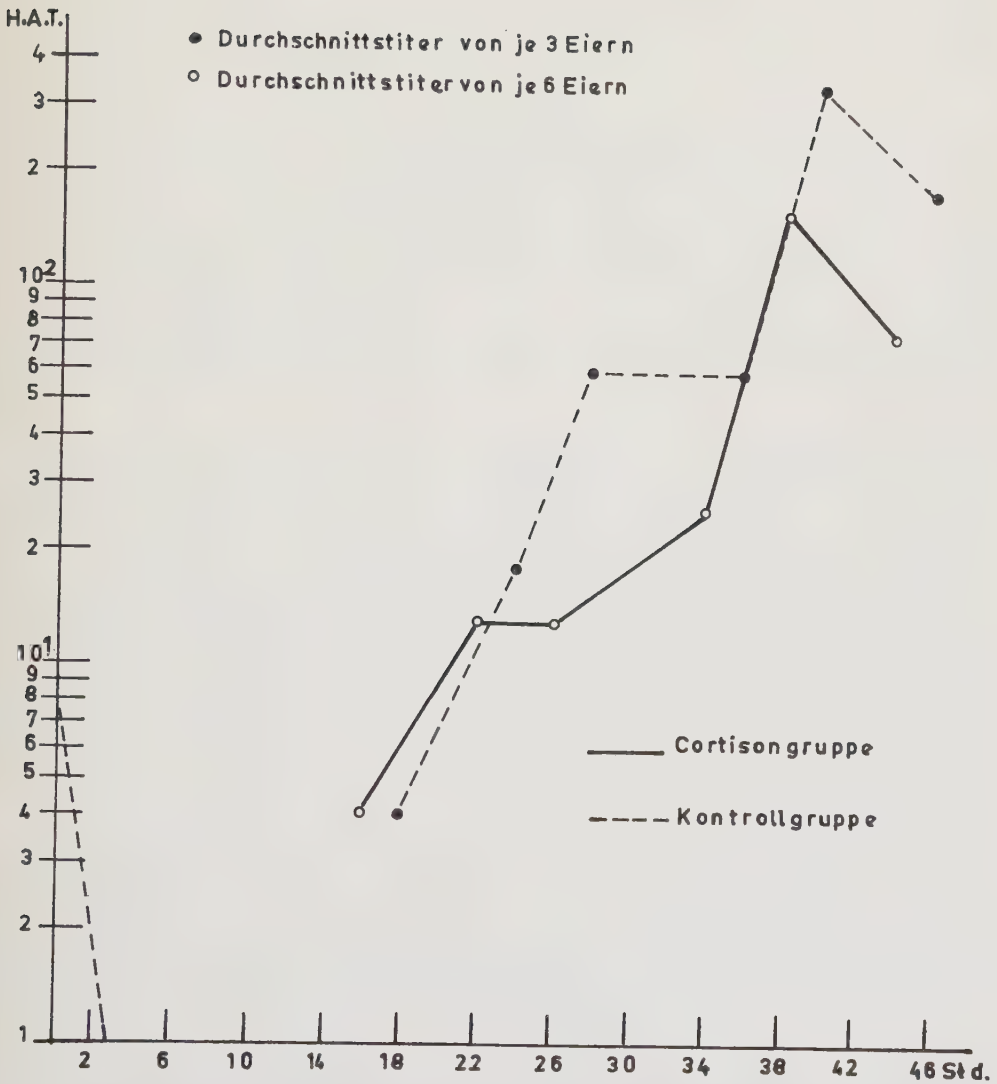
Sauerstoffverbrauch von gleichgrossen Chorioallantoismembranstückchen nach Zusatz von T.C.M.-Nährmedium und Cortison

Einfluß von Cortison auf die Virusmultiplikation im exembryonierten Ei

Nach den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuche war auch eine Beeinflussung der Virusmultiplikation im exembryonierten Brutei durch Cortison zu erwarten. Wir haben 2 Versuche in dieser Richtung durchgeführt. Im ersten Versuch wurden 0,5 mg Cortison je Ei einem Kollektiv von 3 Eiern erst nach der Exembryonierung in die Hankslösung zugegeben. Hierbei zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe und der Cortisongruppe keine deutlichen Unterschiede im Haemagglutinititer-Anstieg. Die kurze Einwirkungsdauer des Cortisons und die schlechte Resorptionsmöglichkeit aus der Hankslösung waren wohl die Ursachen, die in diesem Falle keine Einwirkung auf die Virusmultiplikation zustande kommen ließen (siehe Abb. 10).

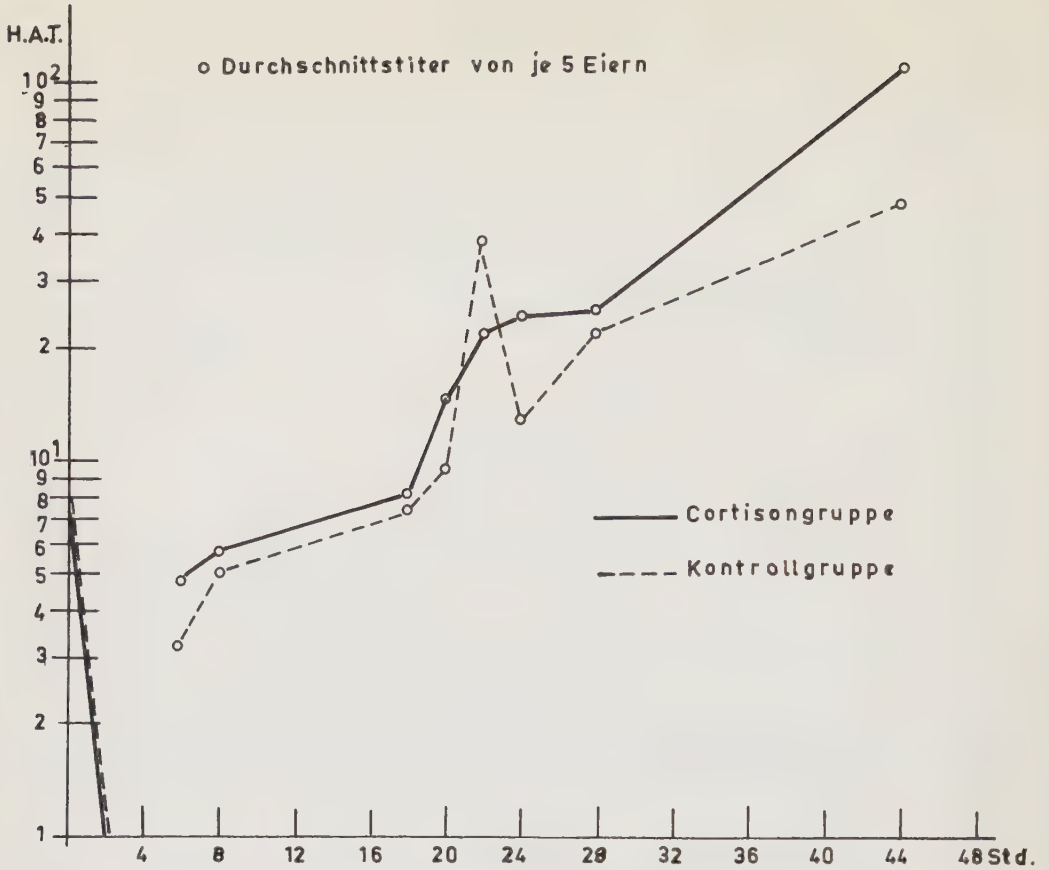
Beim zweiten Versuch hatten wir das Cortison (0,5 mg je Ei) 20 Stunden vor der Exembryonierung einem Kollektiv von 5 Eiern in die Allantoishöhle injiziert. Nachdem die Bruteier auf die bereits angegebene Art exembryoniert und mit je 20 ml infizierter (B-Lee) Hankslösung gefüllt worden waren, wurden sie mit sterilen Gummikappen verschlossen und bei 35°C im Brutschrank nachbebrütet. In bestimmten Abständen wurden 0,5 ml Testflüssigkeit entnommen und der Haemagglutinationstiter bestimmt und als Stundendurchschnittswert von je 5 Eiern in der Kurve eingetragen.

Abb. 10



Haemagglutininintiteranstieg nach Zusatz von 0,5 mg Cortison zur Hankslösung in exembryonierten Brutei

Abb. 11



Haemagglutinantiteranstieg nach Injektion von 0,5 mg Cortison in die Allantoishöhle 20 Stunden vor der Exembryonierung

Ergebnisse:

Wie Abb. 11 zeigt, verläuft die Kurve der Cortisongruppe ständig außer dem 22-Stundenwert, über der Kurve der Kontrollgruppe. Die Latenzzeit ist infolge einer hohen Infektionsdosis (10⁻³) sehr kurz.

Beide Kurven steigen zunächst flach an, dann erfolgt zwischen dem 18- und 22-Stundenwert ein steiler geometrischer Anstieg. Während die Kontrollkurve anschließend plötzlich abfällt und dann bis zum Endwert wieder etwas ansteigt, verläuft die Kurve der Cortisongruppe nach dem 22-Stundenwert zuerst ziemlich flach, um dann bis zum Endwert wieder steiler anzusteigen.

Der Durchschnitts-Haemagglutinantiter der Cortisongruppe liegt beim Maximalwert nach 44 Stunden mehr als doppelt so hoch als der entsprechende Wert der Kontrollgruppe.

Cortison bewirkt also auch im exembryonierten Brutet eine deutliche Steigerung der Virusmultiplikation. Eine initiale Hemmung durch Cortison konnten wir nicht nachweisen. Gegen Ende des Versuchs wird jedoch die Differenz zwischen Cortisongruppe und Kontrolle wesentlich größer.

Diskussion

In einer Reihe von Untersuchungen haben wir uns mit der Methode der Viruszüchtung im exembryonierten Brutei beschäftigt.

Zunächst versuchten wir durch eine Verbesserung des Exembryonierungsverfahrens selbst die Ausgangsbedingungen für die Virusvermehrung im exembryonierten Brutei zu fördern. Die Verbesserungen in dieser Richtung, wie z.B. das Einlegen einer Glasplatte, bedeuten zwar für die Durchführung der Versuche eine wesentliche Erleichterung, doch war die Virusvermehrung weiterhin gegenüber der Virusmultiplikation im intakten Brutei im Rückstand. Da die Virussyntese eng an die Lebensfunktionen der Zelle gekoppelt ist, haben wir versucht, durch eine Verbesserung des Nährsubstrates die Stoffwechselfunktionen der vom Kreislauf abgeschnittenen Membranzellen anzuregen. Dies gelang uns einmal mit Embryonenstückchen als Zusatz zur Hankslösung. Doch hielten uns die schlechte Entnahmefähigkeit von Testflüssigkeit und die Fehlerquellen bei der Bestimmung des Haemagglutinationstiters von einer weiteren Untersuchung dieser Wirkung ab.

Wesentlich bessere Bedingungen und Wirkungen zeigten sich aber nach Zusatz von synthetischem Nährmedium (T.C.M.199). Die Virusmultiplikation war nach Zugabe des T.C.M.-Nährmediums zur Hankslösung eindeutig gesteigert. Als günstigste Konzentration können wir ein Gemisch von 5 %iger T.C.M.-Hankslösung empfehlen.

Es konnte in diesen Versuchen weiterhin gezeigt werden, daß die besseren Vermehrungsbedingungen durch Zusatz von syntetischem Nährmedium mit einer intensivierten und beschleunigten Stoffwechseltätigkeit der Membranzellen im Zusammenhang stehen.

In weiteren Versuchen haben wir uns daher mit der Frage der hormonalen Beeinflussung der Virusinfektion und -multiplikation im exembryonierten Brutei beschäftigt. Hierbei schien uns die Verwendung von Cortison am günstigsten, weil ihm eine besonders starke Einflußnahme auf den Zellstoffwechsel zugeschrieben wird.

Bei der Durchsicht der bisherigen Ergebnisse über die Cortisonwirkung auf die Virusmultiplikation und den Zellstoffwechsel konnten wir feststellen, daß Cortison nicht nur auf einem Wege die Virussyntese beeinflusst. Es liegt vielmehr ein sehr breites Wirkungsspektrum vor. Nicht nur der Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratstoffwechsel der Zelle wird in zum Teil entgegengesetzter Richtung intensiviert, auch die Aktivität und Konzentration der wichtigsten Zellenzyme wird durch Cortison gesteigert. Die Permeabilität der Zellmembran, zumindest aber der Austausch zwischen Zelle und Umgebung wird nicht nur für Salze und Aminosäuren, sondern auch für die Viruseiweißkörper durch die Einwirkung von Cortison begünstigt. Wir haben daher auf Seite 85 versucht, in einem Schema die verschiedenen Einflußwege des Cortisons, die zu einer gesteigerten Virusmultiplikation führen, aufzuzeigen.

Obwohl sich außerordentlich starke Differenzen hinsichtlich des Applikationszeitpunktes, der Applikationsdosis und dem erstelten Effekt am Brutei zeigten, war die starke Wirkung des Cortisons auf den Eiweiß-Stoffwechsel der Hühnerembryonen deutlich sichtbar. Dies zeigte sich eindeutig in der starken katabolen Wirkung, die wir durch Gewichtsbestimmungen der Hühnerembryonen in den verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung nachweisen konnten. Dabei zeigte sich, daß die cortisonbehandelten Embryonen vom 2. bis 10. Tage nach der Cortisongabe zwischen 13,4 und 49 % leichter waren, als die Kontrollen.

Dieser in Richtung des Eiweißabbaus intensivierte Stoffwechsel ließ sich auch im Warburgapparat durch einen deutlich gesteigerten Sauerstoffverbrauch der unter Cortison einfluß stehenden Membranzellen nachweisen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich zum Teil eine vermehrte Eiweißverbrennung. Gleichzeitig konnten wir feststellen, daß schon die Infektion allein eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs der Membranzellen herbeiführt.

Der bei der Gruppe mit infizierten Cortisonmembranen nach 8 Stunden um 69 % gesteigerte Sauerstoffverbrauch ist wahrscheinlich ein Summationseffekt von Infektion und Cortison auf den Zellstoffwechsel zu Gunsten der Virusmultiplikation.

Auch der Zusatz von T.C.M. zur Hankslösung in den Warburg-Kölbchen führte zu einer, wenn auch nicht sehr deutlichen Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Membranzellen. In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, daß die Virussyntese des Influenza-B-Virus nach vorausgegangener Cortisonapplikation in der Chorioallantoismembran des exembryonierten Bruteies gesteigert verläuft.

In Vorversuchen stellten wir fest, daß der Cortisoneffekt hinsichtlich seiner Intensität stammes-spezifische Differenzen erkennen läßt (86). Die Beeinflussung der Virusmultiplikation beim Influenza-B(Lee)-Stamm ist viel stärker als beim Influenza-A(PR8)-Stamm.

Abschließend läßt sich sagen, daß durch die aufgezeigten Verbesserungen des Exembryonierungsverfahrens und des Nährsubstrates die Viruszüchtung im exembryonierten Brutei die ungefähr gleichen Ergebnisse zeigt wie im intakten Brutei, was bei der ausgedehnten Verwendungsmöglichkeit dieser Methode von großem Vorteil ist. Eine dieser bedeutsamen Möglichkeiten im exembryonierten Brutei haben unsere Untersuchungen über die Cortisonwirkung auf die Chorioallantoismembran selbst und auf die Virusvermehrung in dieser Membran gezeigt. Wir können diese verbesserte Methode für das Studium der Virusinfektion, für die Impfstoffgewinnung und für die Austestung virostatistischer und viruzider Mittel empfehlen.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Übersicht über die bisherigen Ergebnisse der Viruszüchtung im intakten und exembryonierten Brutei werden eigene Erfahrungen über die Viruszüchtung im exembryonierten Brutei angegeben. Es wird in einer Reihe von Versuchen gezeigt, daß die Verbesserung des Exembryonierungsverfahrens selbst und die Veränderung des Nährsubstrates, die Virusmultiplikation des Influenza-B-Stammes signifikant steigert.

Anschließend werden die Möglichkeiten einer hormonalen Beeinflussung der Virussynthese diskutiert und nach einer Erklärung der Cortisonwirkung auf die Virusmultiplikation in der Chorioallantoismembran gesucht. Die angegebenen Versuche über die Cortisonwirkung auf das Wachstum der Hühnerembryonen, auf die Atmung der Zellen der Chorioallantoismembran und auf die Virusmultiplikation in dieser Membran zeigen einen Teil der Wege, über die das Cortison die Virussynthese zu beeinflussen vermag.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) Ackermann W.W., Hanlin F., Massab H.F. Growth Characteristics of Influenza Virus.
J.exp.Med. 100, 329-339 (1954)
- 2) Ackermann W.W., Massab H.F. The Role of 1-Methionine in the Virus Propagation.
J.exp.Med. 99, 105 (1954)
- 3) Aronson St.M., Schwarzmann G. Histopathogenesis of Cortisone-altered Experimental Poliomyelitis Observation on the Syrian Hamster inoculated intracerebrally with Strain
MEF 1.Am.J.Path. 29, 383-395 (1953)
- 4) Baker, B.L. A Comparison of the Histological Changes induced by Experimental Hyperadrenocorticalism and Inanition. Recent Progr. in Hormone Res. 7, 331-373 (1952).
- 5) Bernkopf H. Cultivation of Influenza Virus in the Chorio-Allantoic Membrane of Deembryonated Eggs.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 72, 680-682 (1949)
- 6) Beveridge W.J.B., Burnet F.M. The Cultivation of Viruses and Rickettsiae in the Chick Embryo.
H.M.State Off. London (1946)
- 7) Bieling R. Die Pathogenese der Viruserkrankungen.
Zbl.Bakter.I.Orig. 160, 1/5 131-139 (1953)
- 8) Brahms, O., Lippelt H., Müller F. Experimentelle Beiträge zur Frage der Virusinaktivierung
Zbl.Bakter.I.Orig. 163, 426-433 (1955)
- 9) Brummel E., Halkerston J., Reiss M. The Influence of Steroid Hormones on the Energie Metabolism of the Adrenal Cortex in vitro.
J.of Endocrinol. 10, 111-116 (1954)
- 10) Büchner F. Allgemeine Pathologie (Pathologie der Atmung)
München und Berlin 1959
- 11) Burnet F.M. *Med.J.Australie* 2, 687 (1935) (zit.n. Bernkopf)
- 12) Burnet F.M. Influenza Virus Infections of the Chick Embryo Lung.
Brit.J.exp.Path. 21, 147-153 (1940)
- 13) Burnet F.M. Influenza Virus Infections of the Chick Embryo by the Amniotic Route.
I. General Character of the Infection.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 18, 353-360 (1940).
- 14) Burnet F.M. Growth of Influenza Virus in the Allantoic Cavity of the Chick Embryo.
Austr.J.of exp.Biol.Med.Sci. 19, 291-295 (1941)
- 15) Burnet F.M., Bull D.R. Re-Examination of the Influenza Virus Strain "Melbourns Egg".
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 22, 173-178 (1944)
- 16) Burnet F.M. Influenza Virus Infections of the Chick Embryo by the Amniotic Route.
II. Titrations and Serum Neutralisations Tests.
Austr. J.exp.Biol.Med.Sci. 19, 39-44, (1941)
- 17) Burnet F.M. Erkenntnisse über Haemagglutination und Genetik des Grippe Virus.
Angew. Chemie 66, 417-419 (1954)

- 18) Casperson T., Thorson K.G. *Virus und Zellstoffwechsel Klin. Wochr.* 31, 205-212 (1953)
- 19) Cohen S.S. *The Synthesis of Nucleic Acid by Virus-infected Bacteria.* *Bacter. Rev.* 15, 131-146 (1951)
- 20) Dennig H. *Lehrbuch der Inneren Medizin Stuttgart* 1957
- 21) Eaton M.D. *Observations on Growth of Virus and the Energy-yielding Activities of the Host Cell.* *Arch. Virusforsch.* V, 53-72 (1954)
- 22) Engel F.L. *Studies on the Nature of the Protein Catabolic Response to Adrenal Cortical Extract. Accentuation by Insulin Hypoglycemia.* *Endocrinol.* 45, 170-177 (1949)
- 23) Engel F.L. *Further Observations on the Role of the Adrenal cortex on the Metabolism of Amino Acids.* *Endocrinol.* 49, 538-547 (1951)
- 24) Evans H.J. *Action of Cortisols on Developing Chick-Embryo.* *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 83, 31-34 (1953)
- 25) Fazekas de St. Groth S. *Viroperis, the Mechanism of Influenza Virus Infection.* *Nature (Lond.)* 162, 294 (1948)
- 26) Finter N.B., Armitage P. *The Membrane Pieve Technique for in vitro Infectivity Filtration of Influenza Virus.* *J. Hyg. Am.* 55, 434 (1957)
- 27) Flanagan J.B., Davis A.K., Overmann R.R. *Mechanism of Extracellular Sodium and Chloride Depletion in the Adrenal ectomized Dog.* *Am. J. Physiol.* 160, 89-102 (1950)
- 28) Follett R.H. jr. *Effect of 17-Hydroxycorticosterone-21-Acetate on Growing Bones of the Rat.* *Bulletin of the John Hopkins Hosp.* 90, 337-338 (1952)
- 29) Frey J. *Die Bedeutung der NNR-Hormone für den Stoffwechsel energiereicher Phosphatverbindungen der Nieren und damit für die Nierenfunktion.* *2. Symp. d. deutsch. Ges. f. Endocrinol.* 53-57 (1954)
- 30) Geigy J.R. *Wissenschaftl. Tabellen Basel* 1955
- 31) Goodpasture E.W., Woodruff A.M., Budding G.J. *Vaccinal Infection of the Chorio-Allantoic Membrane of the Chick-Embryo.* *Am. J. Path.* 8, 271-281 (1932)
- 32) Gönnert R. *Über Virusmorphologie und Virusvermehrung* *Behring-Werk-Mitteil.* 25, 61 (1952)
- 33) Grajs A., Hausmann H.G. *Über eine für die Desinfektionsmittelpfung optimal geeignete Methode zur Züchtung des Influenza-Mumps- und New Castle Virus in der Allantoishöhle des Hühnerembryos.* *Zschr. Hyg.* 143, 343-354 (1957)
- 34) Green R.H., Freymann M.W. *A Method of Obtaining Influenza Virus Growth Curves in Individual Eggs.* *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 476-478 (1949)

- 35) Groß O., Borneff J. *Ei-Fensterung ohne Perforation der Chorio-Allantois.*
Arch.Hyg. 138, 12-19 (1954)
- 36) Grollmann A. *The Maintenance of the Adrenalectom Dog for prolonged Periods without Recourse to hormonal Therapie.*
Endocrinol. 50 331 (1952)
- 37) Hirst G.K. *The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryo infected with Influenza Virus.*
Science 94, 22-23 (1941)
- 38) Hirst G.K. *The quantitative Determination of Influenza Virus and Antibodies by Means of Red Cells Agglutination.*
Symt.on nature of Virus Multipli-cation.
Soc.of gen.Microbiology (1952)
- 40) Isaacs A., Lindemann *Virus Interference I. The Interferon*
Proc.Royal Soc. B 147, 258-267 (1957)
- 41) Isaacs A., Lindemann, Valentine *Virus Interference II. Some Proper-ties of Interferon.*
Proc.Royal Soc.B. 147, 268-273 (1957)
- 42) Jungblut P.W. *Hormonale Beeinflussung des Amino-säuretransportes durch die Zell-membran.*
Dtsch.Med.Waschr. 22, 979-980 (1958)
- 43) Karnofsky D.A. *Growth inhibiting Effect of Corti-sone Acetate on the Chick Embryo.*
Endocrinol. 48, 696 (1951)
- 44) Kilbourne E.D., Daves L.M. *Influence of Cortisone on Adaptation of Influenza-A-Virus to Mouse Lung.*
Fed.Proc. 12, 449-450 (1952)
- 45) Kilbourne E.D. *Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. II.Effects of Antibody Formation and Acquired Immunity.*
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 90, 685-687 (1955)
- 46) Kilbourne E.D., Horsfall F.L.jr. *Increased Virus in Eggs Injected with Cortisone.*
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 75, 116-118 (1951)
- 47) Kilbourne E.D. *Paradoxial Effects of Cortisone on Influenza-B-Virus of the Chick Embryo.*
J.Clin.Invest. 31, I 643 (1952)
- 48) Kilbourne E.D. *Cortisone Modification of the Dynamics of Influenza Virus Increase.*
Fed.Proc. 15, 597 (1956)
- 49) Kilbourne E.D. *Influence of Cortisone on Exp.Viral Infection. III Effects on Certain Dynamics of Infl.Virus Increase.*
J.exp.Med. 106, 851-862 (1957)
- 50) Kilbourne E.D., Tateno L. *In Vitro Effects of Cortisone on Multiplication of Influenza-B-Virus*
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 82, 274-277 (1953)
- 51) Kilbourne E.D. *Reactication of Non-infective Virus in a Cortisone-trated Host.*
J.exp.Med. 101, 437-450 (1955)
- 52) Köhler H.R. *Über die Pathogenese der Influenzain-fektion des Hühnerembryos nach Virus-injektion in die Allantoishöhle.*
Zbl.Bakt.1. 163, 92 (1955)

- 53) Knight C.A., De Morre L.J. *Les virus études biochemiques et biophysiques récentes.*
New York 1945
- 54) Lambert, R.A. *Variations in the Character of Growth in Tissue Cultures.*
Anat.Record. 6, 91-108 (1913)
- 55) Lange A. *Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie (Tropon)*
München 1958
- 56) Levaditi C., Comandon J., Muttermilch S. *Etude de la vie et de la Croissance des cellules in vitro à l'aide de l'enregistrement cinématographique*
Compt.Rend.Soc.biol. 24, 464-467 (1913)
- 57) Lippelt H., Müller F. *Zum gegenwärtigen Stand der Mumpsforschung.*
Erg.Hyg. 29, 1 (1955)
- 58) Mancini E.E. *Mucoproteinas de la sangre y des tejido conectivo peritumoral en blastomas benignos y malignos.*
Prensa medica argentina 39, 732-736 (1952)
- 59) Morgan J.F., Morton H.J., Parker R.C. *Nutrition of Animal Cells in Tissue Culture. I. Initial Studies on a Synthetic Medium.*
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 73, 1-8 (1950)
- 60) Nigg C., Crowley J.H., Wilson D.E. *The Use of Chick Embryo Tissues and Fluid ad Antigens in the Complement Fixation Reaction in Influenza.*
J.Immunol. 42, 51-70 (1941)
- 61) Pearson H.E. *J.Bact.* 48, 309 (1949)
(zit.n.Köhler)
- 62) Pickmann D.S., Ridley A., Orgel, M., Blumenthal H.T. *Effect of Cortisone on Growth of Chick Embryos during early Embryogenesis.*
Endocrinol. 64, 5 790-794 (1959)
- 63) Poetschke G. *Zur Theorie provozierender und disponierender Faktoren bei der Poliomyelitis.*
Kl.Wschr. 34, 284-291 (1956)
- 64) Ragan C., Howes E.L., Plotz C.M. usw. *Effect of Cortisone on Production of Granulation Tissue in the Rabbit.*
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 72, 718-721 (1949)
- 65) Rasmussen A.F., Waismann H.A., Elvehjen C.A., Clark P.F. *Influence of Thiamin and Riboflavin Deficiencies on Resistance to Theiler's Virus and to Lansing Strain Poliomyelitis in Mice.*
J.Bact. 45, 85 (1943)
- 66) Rhodes A.J., Wood W., Duncan D. *The present place of Virus Laboratory tests in the diagnosis of Poliomyelitis with special reference to tissue-culture techniques.*
Poliomyelitis, World Health Organization Monogr. Series 26, 237-267 (1955)
- 67) Schäfer W., Munk K. *Eigenschaften tierischer Virusarten untersucht an den Geflügelpestviren als Modell. Untersuchungen über den Ablauf der Vermehrung beim Virus der kl. Geflügelpest.*
Zschr.Naturforschung 7b, 608-619 (1952)
- 68) Schramm G. *Chemie der Viren.*
Klin.Wschr. 31, 198-205 (1953)
- 69) Schramm G. *Die Biochemie der Viren.*
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

- 70) Schwarzmann G. *Enhancing Effect of Cortisone upon Poliomyelitis Infection (Strain MEF 1) in Hamster and Mice.* *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 75, 835-838 (1950)
- 71) Schwarzmann G., Gischer A. *Alteration of Experimental Poliomyelitis Infection in the Syrian Hamster with the aid of Cortisone.* *J.exp.Med.* 95, 347-362 (1952)
- 72) Selye H. *Stress. I.Bd.*
Ed.Med.Acta Inc.
Montreal Canada 1950
- 73) Selye H., Schenker V. *A Rapid and Sensitive Method for Bioassay of the adrenal Cortical Hormone.* *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 39, 518-522 (1938)
- 74) Siegert R., Mannweiler E., Oldenburg E. *Erfahrungen mit der Virussüchtung im exembryonierten Brutei.* *Arch.Hyg.* 138, 1-11 (1954)
- 75) Siegert R., Mannweiler E., Hertenstein L., Kropp H. *Untersuchungen über die Vermehrung des Newcastle Virus im exembryonierten Brutei.* *Arb.aus dem Paul Ehrlich-Institut exp.Ther.Frankf.* 51, 167 (1954)
- 76) Silver, Porter *J.of Endocrinol.* 52 518 (1953)
(zit.n.)
- 77) Sinkowics J. *Die Grundlagen der Virusforschung.* Budapest 1956
- 78) Sprössig M. *Austestung virusinaktivierender Eigenschaften von Desinfektionsmitteln im exembryonierten Brutei.* *Arch.Hyg.* 142, 425-440 (1958)
- 79) Sprössig M. *Über die Möglichkeit der Prüfung virushemmender Substanzen im exembryonierten Brutei.* *Z.f.d.ges.Hyg.* 3, 239-247 (1957)
- 80) Sprössig M., Schabinski-Stefan M. *Einfluss des Wirkstoffes aus der Kapuzinerkresse auf die intracelluläre Virussyntese.* *Z.Hyg.* 143, 215-222 (1956)
- 81) Sobel H. *Antagonistic Effect of cortisone and Growth Hormone on the Developing Chick Embryo.* *Soc.exp.Biol.Med.* 97, 495-498 (1958)
- 82) Sobel H. *The Action of Cortisone on the Embryonic Cartilage and Muscle in vitro. Separatum Experimentia* 14/11, 421-425 (1958)
- 83) Tylor A., Carmichel N. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 78, 676 (1951)
(zit.n. Sinkovics)
- 84) Wastelowski E.v., Knick B., Bünning W. *Zur Beeinflussung des Virusinfektes durch Cortison.* *Zbl. Bakter.I.Orig.* 100, 43 (1960)
- 85) Wastelowski E.v., Knick B., *Experimenteller Beitrag zur Cortisonbehandlung am Tier nach Inokulation pathogener und apathogener Mikroorganismen.* *Z.exp.Med.* 129, 548-559 (1958)
unveröffentlichte Versuche
- 86) Wastelowski E.v.
- 87) Watson B.K., Conns A.H. *Studies on Influenza Virus Infection in the Chick Embryo using Fluorescent Antibody.* *J.exp.Med.* 99, 419-428 (1954)

- 88) Weissbecker L. *Klinik der Stoffwechselwirkungen der Steroidhormone.*
2. Symp.d.dtsch.Gesellschaft f. Endokrinologie 70-92 (1954)
- 89) Weichsel H. *Zur Kenntnis der anabolen Wirkung von Steroidhormonen.*
Forschungslaboratorien der Lannacher Heilmittel-Gesellschaft 1960
- 90) Wildbrandt W. *Physiologie und Pharmakologie der Corticosteroide.*
Dtsch.Med.J. 2, 277-282 (1960)
- 91) Woodruff A.W., Goodpasture E.W. *The Susceptibility of Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryo to Infection with the Fowl-Pox Virus.*
Am.J.Path. 7, 209-222 (1931)

L e b e n s l a u f

Ich, Hans Werner Schwirz, wurde am 10. April 1933 in Eppelborn/Saar geboren. Ich bin Sohn des Bergmanns Johann Schwirz und seiner Ehefrau Anna Schwirz geb. Krass.

Nachdem ich in meinem Heimatort 8 Jahre (von Ostern 1939 bis Sommer 1947) die Volksschule besucht hatte, erlernte ich in den 3 darauffolgenden Jahren das Bäckerhandwerk in Neunkirchen/Saar, wo ich im Herbst 1950 mit Erfolg die Gesellenprüfung ablegte. Noch im gleichen Jahr trat ich als Schüler in die Untertertia der realgymnasialen Aufbauschule "Marienhöhe" in Darmstadt ein. Am 23. Februar 1956 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Mein erstes Semester als Medizinstudent begann im Sommer-Semester 1956 an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Nach 2 Semestern bestand ich dort den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung und 3 Semester später an der medizinischen Fakultät in Homburg/Saar das Physikum. Das erste klinische Semester verbrachte ich auch noch in Homburg/Saar. Im Sommersemester 1959 setzte ich mein Studium an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz fort. Nach einer Studienzeit von 5 Semestern hier in Mainz und einem Gesamtstudium von 11 Semestern habe ich Ende Juli 1961 mein Medizinstudium beendet und befinde mich seit Anfang August im Staatsexamen.

Herrn Prof.Dr. Kliewe danke ich für die Gewährung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie für die Übernahme des Korreferates.

Gleichzeitig danke ich Herrn Doz.Dr.v.Wasilewski für die Überlassung des The+mas und für seine wertvollen Ratschläge und die stete Hilfe bei allen Schwierigkeiten, die sich im Laufe der Arbeit ergeben haben.

